



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

***Biofísica del transporte de agua en
plantas: la participación de la raíz de Beta
vulgaris en el ajuste hidráulico en
condiciones de estrés salino***

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: Farmacia y Bioquímica, subárea Ciencias
Biológicas

Tesista: Bioq. Victoria Andrea Vitali

Director: Dra. Gabriela Amodeo

Consejero de Estudios: Dr. Rolando Rossi

*Laboratorio de Relaciones Hídricas - Acuaporinas
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental
Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada*

A mi familia, los que están y los que siempre estarán
A Mamá, Vale, Lucio, y mis amigos por el apoyo incondicional

Agradecimientos

A la educación pública en este país

A la Universidad de Buenos Aires

A la Agencia de Promoción Científica y al CONICET

A todos los compañeros de trabajo con los que tuve el placer de encontrarme pues de todos he aprendido.

A mi directora la Dra. Gabriela Amodeo con la que hemos recorrido juntas tantos años de trabajo y aprendizaje.

A la Dra. Moira Sutka quien me acompañó en la mesada desde el primer día.

A la Dra. Karina Allea quien primero me invitó a recorrer este camino.

A todos los miembros actuales del laboratorio de Relaciones Hídricas: el Lic. Esteban Tubert, la Dra. Milena Manzur y los recientes integrantes: Lic. Andrea Dengis, el Lic. Guillermo Jerez Ferreyra, el Lic. José María Chaín, la Srta. Anabel Di Gaudio, Dra. Irene Baroli y el Dr. Gustavo Gudesblat.

A quienes han compartido el día a día durante tantos años: el Dr. Jorge Bellati, las Dras. María Mercedes Márquez y Cintia Jozefkowicz, el Dr. Agustín Yanneff, la Bioq. Florencia Scochera y la Srta. y futura Bioq. Agustina Cannesa.

Al Dr. Marcelo Ozu por su compañerismo y el espíritu crítico siempre dispuesto a compartir mañanas y tardes de discusiones.

Al Dr. Rolando Rossi por sus consejos y dedicación, a quien aprecio como docente y en esta etapa como consejero de estudios, por su excelente calidad humana y académica.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Física de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, especialmente el apoyo de Prof. Dra. Marcela Zubillaga y la colaboración del Prof. Horacio Torti y el Bioq. Julián Fuda.

A la Dra. Gabriela Soto, el Dr. Nicolás Ayub y el Dr. Osvaldo Chara con quienes tuve la oportunidad de colaborar.

A todos los integrantes del laboratorio de Biomembranas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, donde siempre se ha dado una discusión enriquecedora sobre la actividad científica.

A los miembros del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental y del IBBEA de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires que siempre han tenido una sonrisa hacia mí: Daniela, Paula, Vicky, Emanuel, Pablo, Agustín, Dante, Jorge, Daniel, Cintia, y especialmente a la Prof. Dra. Sara Maldonado, la Dra. María Paula López Fernández y el Lic. Esteban Fernández.

A todos los integrantes del departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos en la estación experimental Zaidín, Granada, España. Especialmente al Prof. Dr. Ricardo Aroca Álvarez y a su equipo de trabajo que me recibió con los brazos abiertos, Dr. Juan Manuel Ruíz Lozano, Pablo Ibort Pereda, Gabriela Quiroga García, Sonia Molina Arias, Tamara María Gómez Gallego, Leyre, Javier Rivero Bravo, Dante Pitzolt.

A quienes me brindaron su apoyo incondicional: mi madre, Vale y Lucio.

A mis queridísimos amigos y amigas que siempre estuvieron dispuestos a brindar una palabra de aliento, la mayor sinceridad y su espíritu crítico:

*Martin, Pancho, Sole, Martín, Andy, Lucho, Inés, Lute, Vero, Fede, Nacho
Vale, Sol, Mariana, Marina, Leti, Maiu, Sol, y Juan*

Breve Resumen

Biofísica del transporte de agua en plantas: la participación de la raíz de *Beta vulgaris* en el ajuste hidráulico en condiciones de estrés salino

El flujo de agua en la raíz se describe como un circuito hidráulico donde la vía celular es poco conductora que no evidencia las propiedades de las membranas biológicas (selectividad y especificidad). En esta tesis, se caracterizaron las propiedades hidráulicas de la raíz de *Beta vulgaris* en la respuesta a corto plazo desencadenada ante el incremento de salinidad del suelo. El órgano raíz, presentó una estrategia hidráulica en forma bimodal, supeditada a un sistema tipo interruptor (*switch*) mediado por el gradiente de potencial hídrico ($\Delta\Psi_{hoja-suelo}$). En cambio, a nivel celular la capacidad de transporte de agua de la raíz estaría acoplada a un transporte de solutos que resultó independiente de $\Delta\Psi_{hoja-suelo}$. Estos resultados sugieren una vía celular activa en la raíz que puede sostener el flujo de agua hacia a la parte aérea, mediante un reducido apoplasto radial y el acoplamiento de flujo de agua a un mecanismo de transporte activo. De esta manera, la dirección del flujo de agua no se encuentra simplemente sujeta al gradiente de potencial hídrico y da cuenta de la existencia de mecanismos sumamente específicos para sostener y garantizar la entrada de agua desde el medio externo hacia la parte aérea.

Abstract

Biophysic of water transport in plants: the role of the *Beta vulgaris* root in hydraulic adjustment under salt stress

In roots, a hydraulic circuit describes two parallel water pathways: the highly resistive cell-to-cell pathway and the apoplast pathway. This topology does not highlight the properties of biological membranes (selectivity and especificity) at the cell-to-cell pathway. Here, we characterized the hydraulic properties of *Beta vulgaris* roots in order to determine the cell-to-cell pathway contribution to the short-term response triggered by the increase of soil salinity. At the organ level, the root hydraulic conductivity takes two different states, in a bimodal form (on-off like switch) due to changes on the $\Delta\Psi_{leaf-soil}$. At the cellular level, the water transport capacity is coupled to solute transport and it was independent of $\Delta\Psi_{leaf-soil}$. Under an opposite water potential gradient, an active cell-to-cell pathway maintains the water flow from roots towards the aerial part while the apoplast pathway has a reduced contribution. Thus, the water potential gradient does not necessarily govern the water flow direction through the cell-to-cell pathway and, it could be proposed that specific mechanisms guarantee the entry and redistribution of water from the soil to the aerial part. The differences reported here suggest an alternative topology of hydraulic circuit to integrate both organ and cell level properties.

Índice General

Agradecimientos.....	3
Breve Resumen.....	4
Abstract	5
Índice General.....	6
Resumen	9
Índice de Figuras.....	12
Índice de Tablas	14
Índice de Ecuaciones	14
Abreviaturas	15
Introducción general	17
1.El movimiento del agua en las plantas.....	17
2.El estudio de las propiedades hidráulicas y el rol de la raíz	22
3.El estrés salino como estrategia experimental.....	25
4.Las características de Beta vulgaris como modelo de estudio	26
5.Hipótesis de trabajo.....	29
6.Objetivos generales.....	29
Capítulo 1	30
Caracterización de las propiedades hidráulicas de Beta vulgaris en la tolerancia al estrés salino	
Introducción.....	31
1.La modulación del flujo de agua en las raíces	31
2.La tolerancia al estrés salino.....	32
3.Antecedentes.....	33
4.Diseño experimental.....	33
5.Objetivo general	34
Descripción del protocolo utilizado en este Capítulo	34
Resultados.....	36
1.Caracterización del nuevo estado hídrico en las plantas de Beta vulgaris en condiciones de tratamiento salino: la transición de fenotipo.....	36
2.Caracterización de las propiedades hidráulicas de la planta asociadas al cambio de fenotipo turgente observado durante el tratamiento	41
3.Caracterización del ajuste radial: modulación de la vía celular y el apoplasto	48
4.Caracterización de las propiedades hidráulicas en las plantas después de la suspensión del tratamiento: la recuperación	51

<i>Discusión</i>	54
1. En las primeras 24 h de tratamiento las plantas de <i>Beta vulgaris</i> alcanzan un nuevo estado estacionario luego de incrementar la salinidad del suelo.	54
2. Las propiedades hidráulicas se encuentran marcadamente reducidas en el nuevo estado estacionario desencadenado ante el tratamiento salino en <i>Beta vulgaris</i>	56
3. Las propiedades hidráulicas fueron equivalentes entre sí para el fenotipo de 4 h y 24 h de tratamiento.	58
4. La reducción en la capacidad de conducción de la raíz (L_{pr}) fue independiente de la modificación del patrón de suberización	59
5. El rol del interruptor físico: la suberización en la raíz.	61
<i>Conclusión</i>	62
Capítulo 2	64
<i>Caracterización del rango de ajuste dinámico de la conductividad hidráulica de la raíz en <i>Beta vulgaris</i> ante el incremento de la salinidad del medio</i>	
<i>Introducción</i>	65
1. Las características del Continuo Suelo - Planta - Atmósfera.	65
2. El modelo compuesto y la analogía eléctrica del circuito	65
3. Antecedentes.	68
4. Diseño experimental.	68
5. Objetivo general	69
<i>Descripción del protocolo utilizado</i>	69
<i>Resultados</i>	70
1. Caracterización del estado hídrico en diferentes condiciones de salinidad	70
2. Caracterización de la respuesta en el vástago ante los tratamientos impuestos	74
3. Caracterización de la respuesta de la raíz ante las tres condiciones impuestas	75
<i>Discusión</i>	83
1. En el rango de concentraciones utilizadas (0-200 mM NaCl), la modulación del Ψ'_h impuso tres diferentes condiciones $\Delta \Psi_h$ en las plantas de <i>Beta vulgaris</i>	83
2. Cuando el potencial hídrico del entorno desfavorece la entrada de agua, los valores de g_s indican una reducción en la demanda de la parte aérea.	84
3. La modulación de la conductividad hidráulica de la raíz presentó una respuesta bimodal	84
4. El movimiento de agua en la raíz a lo largo de la vía radial está modulado por la vía celular	86
<i>Conclusión</i>	87
Capítulo 3	89
<i>Caracterización de la dinámica del volumen vacuolar en <i>Beta vulgaris</i></i>	
<i>Introducción</i>	90
1. La modulación del cambio de volumen en distintos sistemas celulares.	90
2. La vacuola en la célula vegetal	91

3.El pH.....	92
4.Antecedentes.....	93
5.Diseño experimental.....	94
6.Objetivo general:	95
Metodología.....	96
Descripción del protocolo utilizado.....	96
Resultados.....	97
1.Caracterización del cambio de volumen de la vacuola en condiciones hipo-osmóticas e hiper-osmóticas	97
2.Modelado del cambio de volumen de la vacuola en condiciones aniso-osmóticas.....	99
3.Evaluación de los modelos a partir del ajuste a los resultados experimentales en condiciones HIPO.....	108
4.Validación del modelo en otras condiciones	110
5.Determinación de la permeabilidad osmótica del tonoplasto a partir del Modelo de Agua y Solutos.....	117
Discusión	120
1.Asimetría de la dinámica de cambio de volumen ante los tratamientos HIPO e HIPER..	120
2.Modelado de la respuesta osmótica en las vacuolas de raíz de remolacha	121
3.Los Modelos de Agua y de Agua y Volumen no osmótico no reproducen los resultados de volumen relativo obtenidos durante la perfusión en los tratamientos HIPO e HIPER.....	122
4.El Modelo de Agua y tensión de la membrana sugiere que el tonoplasto es extremadamente rígido bajo tratamiento HIPO.....	122
5.El Modelo de Agua y Solute es el que mejor ajusta a los resultados de cambio de volumen en función del tiempo tanto bajo el tratamiento HIPO como HIPER.....	123
6.La respuesta del sistema y del modelo bajo el tratamiento HIPO a diferentes pH.....	125
7.Una interpretación acerca de la relevancia del flujo de solutos en la dinámica del volumen vacuolar	126
Conclusión.....	128
Discusión general	130
Materiales y métodos	134
1.Cultivo hidropónico de plantas de remolacha roja	135
2.Tratamientos aplicados a las plantas de remolacha en cultivo hidropónico.....	136
3.Parámetros medidos en las plantas de remolacha roja.....	137
4.Protocolo utilizado en el modelado del cambio de volumen del tonoplasto	146
Anexo	150
Bibliografía.....	154
Publicaciones.....	171

Resumen

En la fisiología vegetal, el sistema suelo-planta-atmósfera describe el movimiento de agua de las plantas vasculares como un flujo continuo en estado estacionario, asociado a la demanda transpiratoria de la parte aérea. El sistema hidráulico que media el transporte de agua se modela como un circuito eléctrico simple, donde la conductancia hidráulica (L_o) es análoga a la inversa de la resistencia y el gradiente de potencial hídrico ($\Delta\Psi$) es análogo al potencial eléctrico. A diferencia de los circuitos eléctricos simples, una planta desencadena un conjunto de estrategias que le permiten modular tanto el flujo (J_v) como la conductancia ante el gradiente desfavorable ($\Delta\Psi_{hoja-suelo} = \Psi_{hoja} - \Psi_{suelo}$), modificando los tres parámetros involucrados en la Ley de Ohm. En esta tesis se propone evaluar cómo la raíz participa en esta respuesta hidráulica a corto plazo.

En las raíces, los circuitos hidráulicos propuestos están formados por dos cañerías en paralelo (vía radial) que desembocan en una cañería común (vía axial). Esta representación distingue los caminos de la vía radial por su conductancia hidráulica, donde el camino del apoplasto sería más conductor que la vía celular. Ha sido propuesto que en condiciones de baja disponibilidad de agua (*i.e.*: déficit hídrico por incremento en la salinidad del entorno), el flujo de agua se mueve a expensas del gradiente osmótico a través de las membranas celulares en la raíz aunque sea un camino de baja conductividad (Steudle & Peterson, 1998; Steudle, 2000). En estas condiciones la participación de la raíz y especialmente de la vía celular, cobraría especial relevancia en la absorción de agua por la planta. En esta tesis se propone evaluar cómo es la topología del circuito que representa la vía celular y las propiedades selectivas de las membranas en la homeostasis de iones y agua.

Beta vulgaris es un modelo interesante para caracterizar el manejo del agua a lo largo de la planta, por su plasticidad en la modulación de la turgencia cuando se encuentra en medios de elevada salinidad. En esta tesis se aborda la respuesta de esta planta modelo al estrés salino como estrategia experimental para desencadenar un déficit hídrico y evaluar: *i)* la contribución de la conductividad hidráulica de la raíz al manejo del agua de la planta durante el cambio en la turgencia, *ii)* la participación de la vía celular en la modulación del ajuste hidráulico desencadenado, *iii)* la modulación de las propiedades hidráulicas del tonoplasto como elemento involucrado en la vía celular.

Se abordaron dos estrategias experimentales. A nivel orgánico se caracterizaron las propiedades hidráulicas de la parte aérea y de la raíz. En este último órgano, además, se determinó la contribución de distintos elementos del circuito hidráulico, *i.e.*: vía apoplástica, vía celular, deposición de suberina. Esta estrategia experimental permitió caracterizar el rango de modulación de las propiedades hidráulicas de la raíz involucrado en un exitoso manejo del agua y electrolitos en la tolerancia a la salinidad. A nivel celular, a partir de los resultados experimentales de cambio de volumen obtenidos en vacuolas del parénquima de la raíz se realizó una aproximación de modelado. Se construyeron cinco modelos matemáticos para evaluar diferentes hipótesis que pudieran explicar cómo se modula la permeabilidad al agua (P_f) del tonoplasto durante condiciones aniso-osmóticas.

El incremento de la salinidad desencadena una estrategia hidráulica sumamente conservada, reducción de la pérdida de agua en la parte aérea y reducción de la capacidad de transporte en la raíz. Los resultados presentados en esta tesis sugieren que la capacidad intrínseca de transporte de agua en la raíz, L_{pr} , se reduce cuando el gradiente de potencial hídrico entre el suelo y la savia en la hoja es positivo (desfavorable para absorber agua). Por lo tanto, sujeto al potencial hídrico de la hoja existe una condición donde $\Delta\Psi_{hoja-suelo}$ desfavorece el ingreso de agua y entonces, L_{pr} en la raíz se reduce. En *Beta vulgaris* esta reducción presentó una forma tipo encendido-apagado, cuando $\Delta\Psi_{hoja-suelo}$ es positivo L_{pr} permanece reducida en un $\cong 70\%$ respecto a las mediciones realizadas en condiciones control.

Al caracterizar los diferentes elementos que conforman el circuito hidráulico en la raíz, se verificó la relevancia de la vía celular. Los resultados sugieren que: a) la vía celular modificó su capacidad de transporte en el corto plazo, independientemente del gradiente de potencial hídrico; b) el flujo de agua transportado por la vía celular es plausible de ser explicado como acoplado a un mecanismo de transporte activo; c) la aproximación de modelado verificó que el movimiento de agua a través de la membrana del tonoplasto estaría acoplado al movimiento de solutos en condiciones aniso-osmóticas; d) la contribución a la conducción de la vía celular y el apoplasto son equivalentes en contraste a los modelos propuestos.

La forma en que se modula la capacidad de transporte de la vía celular, de la raíz entera y el gradiente de potencial hídrico permite suponer que la representación tradicional de cañerías en paralelo de la vía radial es un modelo limitado para describir la estrategia hidráulica. La diferencia entre estos parámetros incluso permite suponer que las raíces de *Beta vulgaris* son capaces de transportar agua utilizando flujos que están por debajo de su capacidad máxima. En este modelo

vegetal la dirección del flujo de agua no se encuentra simplemente sujeta al gradiente de potencial hídrico, sino que existen mecanismos sumamente específicos para sostener y garantizar la entrada de agua desde el medio externo hacia la parte aérea.

Índice de Figuras

Figura 1: Los caminos propuestos para el movimiento del agua en la raíz.	20
Figura 2: Respuesta de las plántulas de <i>Beta vulgaris</i> frente al incremento de la salinidad del medio de cultivo hidropónico por agregado de NaCl o KCl.	28
Figura 3: Breve descripción del diseño experimental y metodología aplicada en este Capítulo.	35
Figura 4: Efecto del tratamiento en el crecimiento de las plantas de remolacha. A.....	37
Figura 5: Efecto del tratamiento en el estado hídrico de las plantas de remolacha.	39
Figura 6: Relación entre la concentración de Na^+ , y la de K^+ , en las plantas a lo largo del tratamiento.	40
Figura 7: Caracterización de la pérdida de agua asociada a la transpiración en las plantas de <i>Beta vulgaris</i>	42
Figura 8: Caracterización de la conductancia estomática (g_s) en <i>Beta vulgaris</i>	43
Figura 9: Caracterización de las propiedades hidráulicas de las raíces de <i>Beta vulgaris</i> bajo tratamiento salino.	45
Figura 10: Caracterización de las propiedades hidráulicas de las raíces afectadas previamente por el tratamiento salino.	47
Figura 11: Determinación cualitativa de la deposición de suberina en las raíces de <i>Beta vulgaris</i>	49
Figura 12: Caracterización de las propiedades hidráulicas de <i>Beta vulgaris</i> ante la suspensión del tratamiento.	53
Figura 13: El efecto del tratamiento con NaCl en diferentes concentraciones sobre L_{pr} de distintas especies.	59
Figura 14: La analogía eléctrica del circuito hidráulico en las raíces.	67
Figura 15: Breve descripción del diseño experimental y metodología aplicada en este Capítulo.	70
Figura 16 : Estado hídrico de las hojas después de 4 h de tratamiento.	72
Figura 17: Estado hídrico de las hojas después de 24 h de tratamiento.	73
Figura 18: Efecto del tratamiento sobre la diferencia de potencial hídrico ($\Delta\Psi_{x-SH}$) entre la vasculatura y el medio en las plantas de <i>Beta vulgaris</i>	74
Figura 19: Efecto del incremento de salinidad sobre la pérdida de agua en la parte aérea. .	75
Figura 20: Caracterización de la eficiencia en el transporte de agua de la raíz de <i>Beta vulgaris</i> bajo distintas condiciones de salinidad.	76
Figura 21: Efecto de los tratamientos aplicados sobre la conductividad osmótica de la raíz (L_{po}) de <i>Beta vulgaris</i>	78
Figura 22: Caracterización del flujo exudado espontáneo (J_v) en la raíz después del tratamiento con NaCl.	80
Figura 23: Efecto de cicloheximida ($1\ \mu\text{M}$) en el flujo exudado espontáneo (J_v) en las raíces de <i>Beta vulgaris</i>	81
Figura 24: Determinación de la contribución de la vía apoplástica al flujo de agua transportado en las raíces de <i>Beta vulgaris</i> después de 4 h de tratamiento.....	82
Figura 25: La variación relativa que presenta la L_{pr} en <i>Arabidopsis thaliana</i> crecida en cultivo hidropónico comparado con <i>Beta vulgaris</i> , en presencia de NaCl.	85
Figura 26: Breve descripción del diseño experimental y la metodología utilizada en el capítulo.....	96
Figura 27: Caracterización del cambio de volumen en la vacuola de remolacha en condiciones hipo-osmótica e hiper-osmóticas.	98

<i>Figura 28: Modelos propuestos para analizar la dinámica de cambio de volumen de la vacuola de remolacha en condiciones hipo-osmóticas.</i>	<i>101</i>
<i>Figura 29: Modelos propuestos para analizar la dinámica de cambio de volumen de la vacuola de remolacha en condiciones hiper-osmóticas.</i>	<i>107</i>
<i>Figura 30: Cambio de volumen de las vacuolas en función del tiempo a pH 7.6 en condiciones HIPO y ajustes obtenidos con los diferentes modelos planteados.</i>	<i>108</i>
<i>Figura 31 : Cambio de volumen de las vacuolas en función del tiempo a pH: 7.6 en condiciones HIPER.</i>	<i>111</i>
<i>Figura 32: Resultado del ajuste del Modelo de Agua y Solutos a los resultados experimentales de volumen relativo en función del tiempo en condiciones HIPO.</i>	<i>117</i>
<i>Figura 33: Comparación de los resultados obtenidos para los parámetros del Modelo de Agua y Solutos a partir del ajuste.</i>	<i>118</i>
<i>Figura 34: Exploración del espacio de parámetros del Modelo de Agua y Solutos.</i>	<i>119</i>
<i>Figura 35: Esquema del protocolo de germinación de las plantas de remolacha.</i>	<i>135</i>
<i>Figura 36: Evaluación de la conductancia estomática (g_s) en hojas de la misma planta a lo largo del día.</i>	<i>140</i>
<i>Figura 37: Determinación de la conductividad hidráulica de la raíz (L_{pr}).</i>	<i>143</i>
<i>Figura 38: Concentración total de Na^+ y K^+ a lo largo del tratamiento.</i>	<i>151</i>
<i>Figura 39: Determinación del efecto del tratamiento salino en el crecimiento relativo foliar.</i>	<i>152</i>
<i>Figura 40: Efecto del tratamiento salino sobre el desarrollo de las plantas después de 8 días en el mismo.</i>	<i>153</i>

Índice de Tablas

Tabla 1: Potencial osmótico (Ψ_{osm} , medido en MPa) determinado a partir de la savia de la hoja a lo largo del ensayo.	38
Tabla 2: Cinética de la osmolalidad en los ensayos de perfusión.	99
Tabla 3: Parámetros obtenidos del mejor ajuste de cada uno de los modelos a partir de los resultados experimentales a pH: 7.6, en condiciones HIPO.....	109
Tabla 4: Parámetros obtenidos del ajuste para cada uno de los modelos a partir de los resultados experimentales a pH: 7.6 en el tratamiento hiper-osmótico.	112
Tabla 5: Resultados obtenidos del ajuste de los modelos a partir de los resultados experimentales en condiciones HIPO en cinco condiciones de pH.....	114
Tabla 6: Resultados obtenidos para los parámetros del ajuste del Modelo de A-S en todos los experimentos realizados.	116
Tabla 7: Composición de la solución Hoagland (SH).....	137
Tabla 8: Composición de las soluciones utilizadas en los ensayos de perfusión.....	148

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1.....	22
Ecuación 2.....	65
Ecuación 3.....	66
Ecuación 4.....	102
Ecuación 5.....	102
Ecuación 6.....	102
Ecuación 7.....	103
Ecuación 8.....	103
Ecuación 9.....	103
Ecuación 10.....	104
Ecuación 11.....	104
Ecuación 12.....	105
Ecuación 13.....	105
Ecuación 14.....	105
Ecuación 15.....	106
Ecuación 16.....	117
Ecuación 17.....	140
Ecuación 18.....	144
Ecuación 19.....	145

Abreviaturas

A: área de la vacuola (cm^2)

A_i: área foliar en un tiempo *i* (cm^2)

A₀: área foliar en un tiempo inicial, 0 h (cm^2)

ΔP : diferencia de presión (MPa)

B_v: *Beta vulgaris*

CA: contenido de agua

C_e: osmolalidad de la solución externa en los ensayos de perfusión

C_e': osmolalidad de la solución externa en los ensayos de perfusión a tiempo final

C_i: osmolalidad del interior de la vacuola

CHX: cicloheximida

CRA: contenido relativo de agua

E: tasa transpiratoria ($\text{mL m}^{-2} \text{h}^{-1}$)

E₂: tasa transpiratoria de acuerdo a lo detallado en el capítulo 2 ($\text{mL m}^{-2} \text{h}^{-1}$)

EST: acrónimo de “expressed sequence tag”, en español marcador de secuencia expresada

\mathcal{E} : coeficiente elástico volumétrico del tonoplasto (MPa)

DMSO: dimetilsulfóxido

g_s: conductancia estomática ($\text{mmol s}^{-1} \text{m}^{-2}$)

HIPO: tratamiento hipo-osmótico de perfusión en el aislamiento de vacuolas

HIPER: tratamiento hiper-osmótico de perfusión en el aislamiento de vacuolas

ISO: solución iso-osmótica utilizada en los ensayos de perfusión en vacuolas aisladas

K: constante de tiempo obtenida del ajuste de la función exponencial de osmolalidad en función del tiempo

K_{planta}: conductancia de la planta ($\text{mL h}^{-1} \text{MPa}^{-1}$)

J_v^{H₂O}: flujo de agua ($\text{gH}_2\text{O h}^{-1} \text{gPS}^{-1}$)

J_v: flujo de agua (mL s^{-1})

L_{pr}: conductividad hidráulica de la raíz ($\text{mL h}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{gPS}^{-1}$)

L_{po}: conductividad osmótica de la raíz ($\text{gH}_2\text{O h}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{gPS}^{-1}$)

L_o: conductancia hidráulica de la raíz ($\text{mL h}^{-1} \text{MPa}^{-1}$)

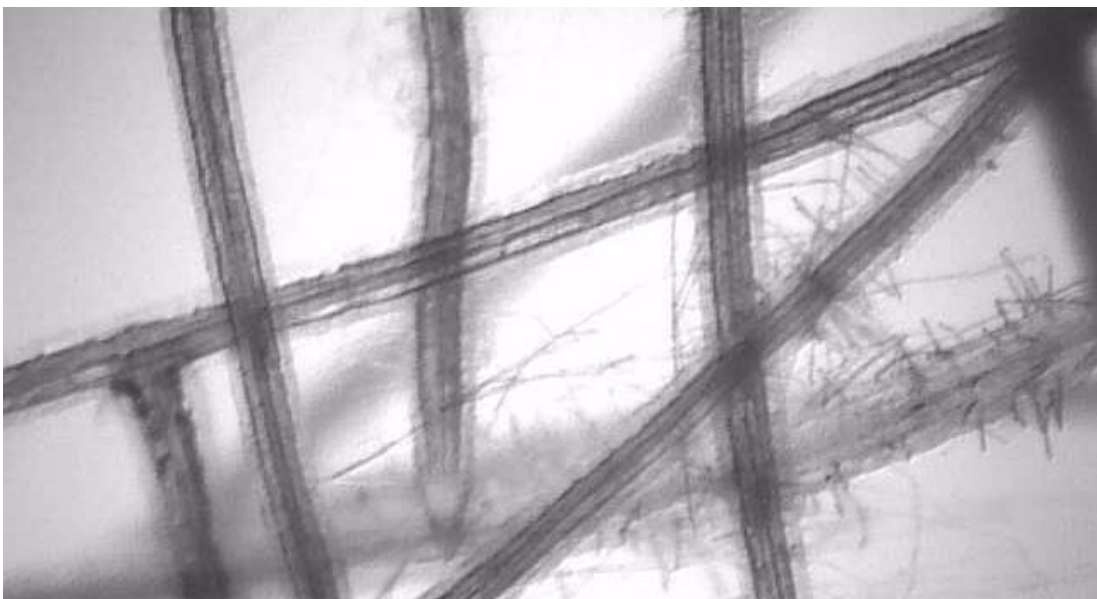
M₀: número total de moles de soluto en el interior de la vacuola

P_f : permeabilidad osmótica al agua del tonoplasto (cm s^{-1})
 P_s : permeabilidad a solutos del tonoplasto (cm s^{-1})
 PAR: siglas de “photosynthetically active radiation”, en español radiación fotosintéticamente activa
 PF: peso fresco (g)
 PM: peso molecular (g mol^{-1})
 PIP: plasma membrane intrinsic proteins, acuaporinas de membrana plasmática
 PS: peso seco (g)
 PT: peso de máxima turgencia (g)
 P1: peso inicial del Eppendorf con una torunda de algodón en la metodología de L_{po}
 P2: peso final del Eppendorf con una torunda de algodón en la metodología de L_{po}
 R: constante universal de los gases ideales ($8.314472, \text{cm}^3 \text{MPa K}^{-1} \text{mol}^{-1}$)
 R_{apo} : resistencia hidráulica de la vía apoplástica
 R_{ax} : resistencia hidráulica de la vía axial
 R_{cel} : resistencia hidráulica de la vía celular
 R_{raiz} : resistencia hidráulica del órgano raíz
 SH: Solución Hoagland
 SPAC: continuo suelo-planta –atmósfera
 T: temperatura absoluta (K)
 TCR: tasa de crecimiento relativo
 TIP: tonoplast intrinsic proteins, acuaporinas de tonoplasto
 V_b : volumen no osmótico (cm^3)
 V_i : volumen osmóticamente activo (cm^3)
 V_w : volumen molar parcial del agua ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)
 V_r : volumen relativo del estado estacionario, V_f/V_o
 Ψ_h' : potencial hídrico aparente de la hoja (MPa)
 Ψ_o : potencial osmótico de la hoja (MPa)
 Ψ_p : potencial de presión turgente de la hoja (MPa)
 Ψ_s : potencial hídrico del suelo o de la solución externa (MPa)

Aclaración

Al igual que los términos incluidos en latín se encuentran en *itálica*, se ha utilizado el mismo criterio para otras palabras que se han conservado en su idioma original y los neologismos incluidos (ej.: *sensado*). Este término refiere a la acción que realiza un sensor. En el área de la Biología se ha incorporado este neologismo derivado del correspondiente vocablo inglés, *sensing*.

Introducción general



1. El movimiento del agua en las plantas

El movimiento del agua a través de las plantas vasculares se describe como un flujo continuo en estado estacionario (van den Honert, 1948) que se da a través de la planta desde el suelo hasta la atmósfera a través de la planta. En analogía con la Ley de Ohm, en las plantas el flujo pasivo de agua ingresa impulsado por el gradiente de potencial hídrico entre la parte aérea y el suelo (Philip, 1966). La planta, en este circuito, se representa como una gran resistencia, formada por pequeñas resistencias a través de las cuales se desplaza el flujo de agua en el denominado **continuo suelo-planta-atmósfera** o SPAC (Philip, 1966; Tardieu & Davies, 1993; Suku *et al.*, 2014). Este modelo, si bien es ampliamente utilizado, encuentra una limitación al describir las relaciones hidráulicas bajo la suposición de que la planta se encuentra en estado estacionario (Somma *et al.*, 1998). Esta suposición excluye fenómenos biológicos como la embolia, la cavitación, y especialmente la posibilidad de redistribución del agua a través de caminos alternativos diferentes (Kirkham, 2002; Zhuang *et al.*, 2014). Estas condiciones claves para el estudio de la fisiología de las plantas porque ocurren ante diferentes situaciones del entorno, incluyendo situaciones de estrés.

En la parte aérea de la planta se produce la mayor pérdida de agua dentro del organismo, como consecuencia de los procesos metabólicos de fotosíntesis y respiración celular. Se considera que durante las horas del día la demanda transpiratoria en la parte aérea es la principal contribuyente de la fuerza motriz que asegura la entrada de agua a través de las raíces (Sack & Holbrook, 2006). Por lo tanto, los estudios asociados al balance de agua en plantas han caracterizado detalladamente los mecanismos asociados a la apertura y cierre del ostíolo en el estoma¹ (Taiz & Zeiger, 2015). A través de diferentes vías de señalización asociadas a la disminución de potencial hídrico en la hoja, o el cambio en la intensidad lumínica, se modula la apertura y cierre del estoma ante condiciones de estrés biótico y abiótico (Casson *et al.*, 2010). La conductancia estomática (g_s) es la propiedad hidráulica que está íntimamente ligada a la pérdida de agua como consecuencia de la transpiración. El estudio de las relaciones hídricas constituye un área clave de la fisiología vegetal y esencial para el desarrollo de la agricultura especialmente en ecosistemas donde resulta crítico desencadenar estrategias para la conservación del agua y mantener la producción y desarrollo de diferentes especies vegetales (Reguera *et al.*, 2012). En

¹Los estomas de las hojas y tallos son estructuras formadas por dos células oclusivas de forma arriñonada, responsables de regular la apertura y cierre del poro denominado ostíolo. A través de este poro se produce el intercambio de gases de la planta con el medio, ingresando dióxido de carbono (CO_2) y saliendo agua (H_2O) y oxígeno (O_2).

este aspecto, en conjunto con los ajustes en la parte aérea de la planta también deben considerarse los mecanismos asociados al proceso de absorción de agua por las raíces. En este órgano se produce el contrapunto entre la demanda de agua por la parte aérea de la planta, y la absorción de agua desde el suelo. De acuerdo con la disponibilidad de agua en el entorno, en algunas especies se desencadenan mecanismos de tolerancia. En la última década, se ha prestado considerable atención a descubrir en qué forma impactan las propiedades hidráulicas de la raíz en la captación *total* de agua en la planta (Steudle & Peterson, 1998; Steudle, 2000; Tyree, 2003; Suku *et al.*, 2014).

El modelo más aceptado actualmente que describe el movimiento de agua en la raíz se denomina modelo compuesto (Steudle *et al.*, 1993). Este describe los caminos que el flujo de agua puede tomar a través de la raíz, al ingresar a la planta, hasta llegar a la vasculatura. El transporte de agua a corta distancia puede darse por tres vías principales: a) el camino apoplástico, que es la vía que ofrece menor resistencia y distribuye el agua a través de las paredes celulares hasta llegar a la vasculatura; b) el camino transcelular, que involucra el pasaje de agua a través de las membranas celulares, plasmática y la de la vacuola (tonoplasto)²; c) el camino simplástico, en el que una vez que se atraviesa la membrana celular, el flujo de agua se distribuye a través de las conexiones intercelulares conocidas como plasmodesmos que conforman una vía continua y selectiva entre los protoplasmas (**Figura 1**). Estas dos últimas vías (simplasto y transcelular) no pueden diferenciarse metodológicamente por lo que se las conoce en conjunto como vía celular o célula a célula. El flujo de agua que se desplaza a través del apoplasto puede estar además limitado por una barrera física hidrofóbica localizada en la exo- y/o endodermis, que se forma por la deposición de suberina en la denominada banda de Caspary. En consecuencia, el agua al menos debe atravesar una membrana para ingresar en la vasculatura (Enstone & Peterson, 1997, 1998; Enstone *et al.*, 2002, Zimmermann & Steudle, 1998, Zimmermann *et al.*, 2000). Por lo tanto, las membranas desempeñan un rol esencial en el movimiento de agua en la raíz.

² Este camino puede incluir todas las membranas que conforman las células. Se menciona solo el tonoplasto porque ha sido especialmente caracterizado respecto de sus propiedades osmóticas.

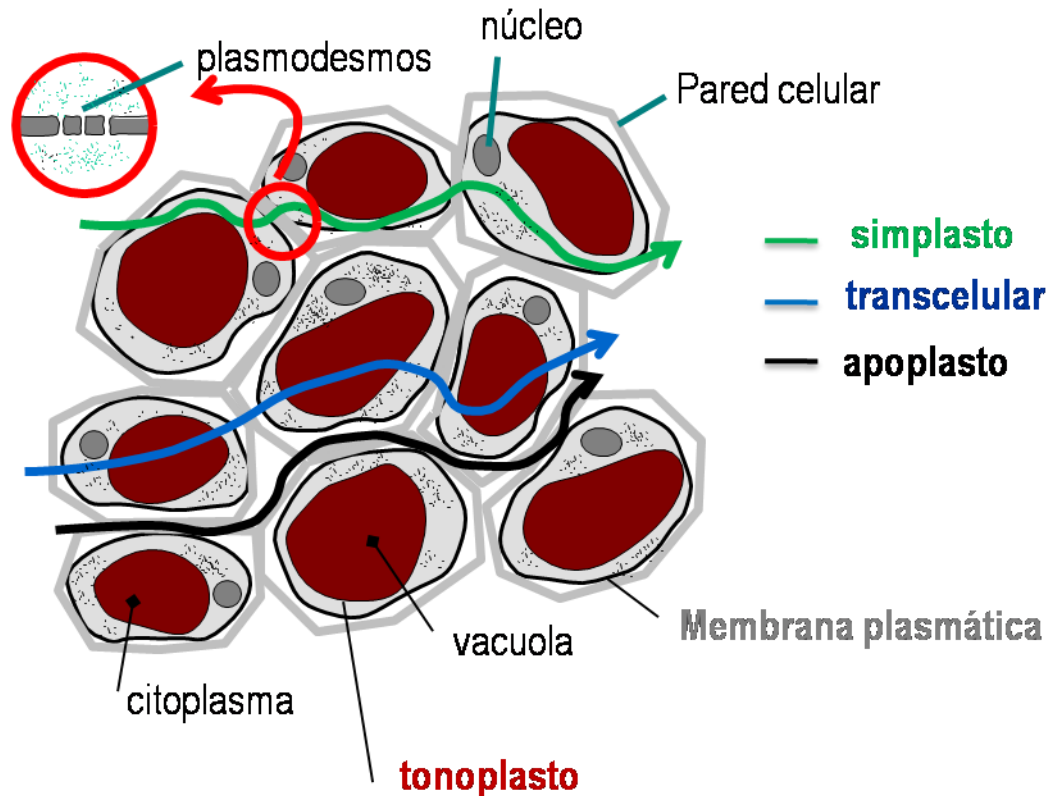


Figura 1: Los caminos propuestos para el movimiento del agua en la raíz. El modelo compuesto propone que el flujo de agua a través del tejido de la raíz puede moverse por tres caminos posibles: 1) apoplasto (negro); 2) transcelular (azul); 3) simplasto (verde). En el apoplasto, el flujo de agua se mueve principalmente a expensas del gradiente de potencial de presión (Ψ_p) entre dos puntos del sistema. En este camino el agua se desplaza recorriendo los espacios intercelulares. El flujo de agua en la vía celular se mueve a expensas del gradiente de potencial hídrico determinado por la diferencia de potencial osmótico y de presión a lo largo del tejido ($\Psi_h = \Psi_\pi + \Psi_p$). En el camino transcelular el flujo de agua se desplaza atravesando las membranas celulares, especialmente la membrana plasmática y el tonoplasto (membrana que delimita la vacuola). El camino denominado simplasto es el que recorre el flujo de agua que se desplaza a través de los plasmodesmos. En conjunto los caminos transcelular y simplasto no pueden diferenciarse metodológicamente, y suele describirse como una única vía nombrada como vía celular o célula a célula.

De acuerdo con este modelo, los dos caminos son vías paralelas donde la contribución de cada uno al movimiento de agua está sujeta a la naturaleza e intensidad de la fuerza impulsora: gradiente de potencial de presión o gradiente de potencial osmótico. En la vía apoplástica, el gradiente de potencial de presión promueve el movimiento del flujo de agua. En la vía celular, el gradiente de potencial hídrico (potencial osmótico y potencial de presión) promueve el movimiento del flujo de agua. Se propone que existe un cambio tipo interruptor³ entre el modo hidráulico, dirigido por el potencial de presión y el modo osmótico, para promover el movimiento de agua a través de la raíz. En condiciones de elevada demanda transpiratoria (modo

³ En Steudle (2000), se refiere a “switch” entre las fuerzas impulsoras.

hidráulico), el camino preponderante para el agua sería la vía apoplástica pues la fuerza motriz es alta (Ψ_h) y la vía presenta una baja resistencia al pasaje de agua respecto a la resistencia que opone la vía celular. Entonces, cuando la demanda transpiratoria disminuye se modifica la fuerza impulsora, el flujo de agua se mueve como consecuencia del gradiente osmótico a través de las membranas celulares que presenta una elevada resistencia a través de la raíz. En condiciones de déficit hídrico, la suberización de la endodermis constituye una barrera física para discriminar entre ambos caminos (Steudle & Peterson, 1998; Steudle, 2000).

Dadas las características del modelo, la permeabilidad al agua y a solutos de las membranas desempeña un rol crucial en el intercambio de agua de la planta con el medio. El descubrimiento de las acuaporinas contribuyó a reevaluar el paradigma sobre la capacidad de transporte de membrana en términos de agua y/o ciertos solutos o gases (Maurel *et al.*, 1997; Javot, 2002; Tyerman *et al.*, 2002; Hachez *et al.*, 2010; Alleva *et al.*, 2012; Chaumont *et al.*, 2014).

Las acuaporinas son proteínas miembros de la familia MIP (*Membrane Intrinsic Proteins*), donde un gran número de genes codificantes para acuaporinas han sido descritos para distintas especies, i.e.: *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* presentan más de 30 acuaporinas diferentes (Postaire *et al.*, 2008). Su presencia, ubicuidad y abundancia constituyen la base molecular sobre los mecanismos involucrados en la regulación del transporte de agua. Actualmente se postula que las acuaporinas desempeñan un papel fundamental en cuanto al dominio del pasaje de agua por la vía celular (Maurel *et al.*, 2010; Knipfer & Fricke, 2011; Chaumont *et al.*, 2014). Por lo tanto, los mecanismos de modulación del transporte de agua en estas proteínas tendrían una relevancia sustancial en la capacidad de transporte de agua en los órganos vegetales como la raíz, y en su capacidad tolerante ante condiciones desfavorables del medio. Esta gran familia de acuaporinas está organizada en diferentes subfamilias, entre éstas, las principales transportadoras de agua han mostrado ser las PIP (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*) y algunas TIPs (*Tonoplast Intrinsic Proteins*). En diferentes situaciones de estrés para las plantas, si bien se han identificado algunas acuaporinas como canales relevantes en la tolerancia (Heinen *et al.*, 2009; Aroca *et al.*, 2012), aún no se ha esclarecido qué rol desempeña las acuaporinas durante el estrés salino. Los estudios enfocados principalmente en la subfamilia PIP muestran que algunos de estos canales aumentan su expresión, mientras otros bajan o permanecen constantes en situaciones de estrés. En consecuencia, la información disponible sobre el impacto de estos genes en la fisiología vegetal no es del todo clara (Jang *et al.* 2004; Alexandersson *et al.* 2005; Lian *et al.* 2004; una revisión en este aspecto puede

consultarse en Yaneff *et al.* 2015). Las TIPs se encuentran menos estudiadas, se sabe que pueden re-localizarse a diferentes membranas, por lo que no están confinadas al tonoplasto y han mostrado que modifican su expresión ante ciertas situaciones de estrés (embolia, Secchi *et al.* 2007; estrés salino, Luu *et al.* 2011).

2. El estudio de las propiedades hidráulicas y el rol de la raíz

Si bien en los últimos 20 años ha habido una gran exploración de las relaciones entre genes y respuestas específicas. Existen leyes físico-químicas que dan cuenta de la relación entre diferentes propiedades de las plantas, *i.e.*: la difusión de los gases es crucial en la relación entre la conductancia estomática y la fotosíntesis. Por lo tanto, no podemos perder de vista que las relaciones determinísticas que están presentes y gobiernan el metabolismo de las plantas (Tardieu *et al.*, 2015).

El sistema hidráulico involucrado en el transporte de agua se modela análogamente a un circuito eléctrico simple donde la diferencia de potencial eléctrico entre dos partes cualesquiera del sistema es la diferencia en el potencial hídrico ($\Delta\Psi$) entre dos puntos; la corriente eléctrica es el flujo de agua (J_v) o corriente transpiratoria a lo largo de la sección definida; y finalmente R es la resistencia hidráulica cuyas unidades dependerán de los términos en que se expresaron la corriente y la diferencia de potencial (Kirkham, 2002).

$$\Delta\Psi = R * J_v$$

Ecuación 1

En este tipo de circuito, dado un gradiente de potencial hídrico ($\Delta\Psi$, MPa), cuando se produce un aumento o disminución del flujo de agua (J_v) se reflejará en un cambio de R . En el campo de la fisiología vegetal en lugar de referirse a resistencia suele referirse a la conductancia hidráulica (L_o) que es la inversa de la resistencia. Por lo tanto, para entender el proceso de absorción de agua por parte de las raíces debemos considerar tanto la fuerza impulsora (*i.e.*, el gradiente de potencial hídrico en el continuo suelo-planta-atmósfera) como la conductancia hidráulica de las raíces (L_o). Esta propiedad suele considerarse en función de la unidad de área o de la unidad de masa (peso seco o peso fresco) para poder comparar distintas plantas entre sí, entonces se denomina conductividad hidráulica (L_{pr}). Este parámetro define la capacidad intrínseca de transporte para movilizar agua a favor del gradiente de potencial hídrico en un órgano, por ejemplo la raíz.

2.1. Los componentes del circuito hidráulico en las plantas

Los tres principales órganos de la planta -raíz, tallo y hojas- cambian el tamaño, área conductora y número de vasos a lo largo del desarrollo garantizando el flujo de agua necesario para sostener el crecimiento del individuo y la distribución hidráulica en los tejidos (Suku *et al.*, 2014).

En la hoja, el intercambio de gases a través de los estomas es la principal vía de pérdida de agua de las plantas. Por lo tanto, el número de estomas presente en una hoja, junto con la apertura estomática y los requerimientos de CO₂ en la planta para la fotosíntesis son los principales elementos involucrados en la regulación de la pérdida de agua a través de la parte aérea. Los mecanismos de modulación de la conductancia estomática (g_s) involucra al menos dos aspectos i) la sensibilidad a la tasa transpiratoria y el conjunto de señales aparejadas *dentro* de la hoja y, ii) la sensibilidad a la reducción en el potencial hídrico del suelo y su efecto en la turgencia de la hoja (Tardieu & Davies, 1993; Dewar, 2002; Gao *et al.*, 2002; Franks *et al.*, 2007).

En el caso del tallo, dada su importancia para comunicar la raíz y las hojas, los haces vasculares del xilema son los elementos responsables de la conducción del flujo de agua. La resistencia que estos ofrecen al movimiento de agua está directamente asociada a su longitud. Cuando aumenta el número de haces vasculares y/o el diámetro de los mismos se facilita la conducción (Tyree, 2003). En este órgano, las vías del camino de agua se describen por analogía con la Ley de Hagen-Poiseuille donde además es crucial la modificación de la viscosidad del fluido (Tyree & Zimmermann, 2002). En este contexto, se propone a los haces vasculares como resistencias en paralelo donde cada una puede representarse como cañerías cilíndricas.

En la raíz, la entrada de agua desde el suelo está modulada tanto por las características de la matriz que rodea a la raíz como por las propiedades de la vía radial que comunica la epidermis radical con la vasculatura. El pasaje por la vía radial hasta la vasculatura constituye el elemento resistivo más importante dentro de la raíz. Los caminos propuestos para el flujo de agua a través de raíz se clasifican como radiales o axiales, según se refiera al flujo de agua desde la epidermis hacia la vasculatura, o el flujo de agua en la vasculatura, respectivamente. Este último elemento, la resistencia axial, presentaría una resistencia despreciable frente a los restantes elementos del circuito. Por ejemplo, en maíz la resistencia axial es entre 300 a 500 veces menor a la resistencia radial de las raíces (Tyree, 2003). En cambio, la vía radial es un camino sinuoso determinado por el pasaje a través de las

membranas y espacios intercelulares presentados en la **Figura 1**. El pasaje radial de agua en la raíz se propone como un conjunto de resistencias asociadas en paralelo, donde el apoplasto tendría una menor resistencia que la vía celular al pasaje de agua (Knipfer & Fricke, 2010).

2.2. La modulación de la conductividad hidráulica de la raíz

En esta Tesis se propone explorar cómo se modulan en conjunto los caminos del agua y modifican la capacidad intrínseca para conducir agua a favor de gradiente en la raíz, es decir modular la conductividad hidráulica, L_{pr} .

En la última década se ha confirmado que la conductividad hidráulica de las raíces puede variar sustancialmente en diferentes condiciones ambientales, por lo que constituye uno de los puntos clave en la regulación del estado hídrico de las plantas (Vandeleur *et al.*, 2009, 2014; Sutka *et al.* 2011; Y. Wu *et al.*, 2012). Han sido descritos mecanismos reversibles e irreversibles involucrados en la modulación de L_{pr} . En el corto plazo (minutos a horas), los mecanismos reversibles incluyen principalmente la disminución de L_{pr} como consecuencia de la modulación de las acuaporinas por mecanismos post-transduccionales (Boursiac *et al.*, 2005, 2008; Luu *et al.*, 2011) o por cambios a nivel transcripcional (Jang *et al.*, 2004; Mahdieh *et al.*, 2008; Casado-Vela *et al.*, 2010; Horie *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). En el largo plazo (días a meses), se producen cambios de carácter irreversible en la arquitectura radical (Galvan-Ampudia *et al.*, 2011; Horie *et al.*, 2012) y la anatomía de la raíz (Bramley *et al.* 2009; Krishnamurthy *et al.* 2011; Sutka *et al.* 2011) asociados a la aclimatación (Munns & Tester, 2008; Horie *et al.*, 2012).

Se ha demostrado en diferentes trabajos que la conductividad hidráulica de la raíz (L_{pr}) es modulada en escalas temporales relativamente rápidas en forma reversible (Matsuo *et al.*, 2009; Vandeleur *et al.*, 2009; Casado-Vela *et al.*, 2010). En diferentes especies vegetales, los mismos agentes que modifican la permeabilidad al agua de las membranas celulares (cuando expresan acuaporinas) también modifican L_{pr} . Cuando se añade HgCl_2 al medio o se induce la acidificación de la raíz (agregado de ácido propiónico o de azida sódica), se observa una significativa reducción de la conductividad hidráulica de la raíz en diferentes especies vegetales (Carvajal *et al.*, 1999; Martínez-Ballesta *et al.*, 2003; Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Ehlert *et al.*, 2009; Sutka *et al.*, 2011; Gambetta *et al.*, 2013; Vandeleur *et al.*, 2014). Se postula por lo tanto que los diferentes mecanismos reversibles que modulan la permeabilidad al agua mediada por proteínas de la familia de acuaporinas PIPs también modifican significativamente la L_{pr} en las raíces. En cebada se ha reportado no solo la

modificación de L_{pr} por los inhibidores reversibles de las PIPs, sino que mediante estudios de localización *in situ* se ha propuesto específicamente qué miembros de la familia PIP contribuyen a la conducción de raíces adventicias o seminales (Knipfer & Fricke, 2011).

Estos resultados en conjunto respaldan la hipótesis donde la vía celular es el componente del circuito hidráulico responsable de la modulación a corto plazo del movimiento de agua en la raíz a través de las acuaporinas. Sin embargo, esta modulación parece simplemente dirigir una reducción en la capacidad intrínseca de la raíz.

3. El estrés salino como estrategia experimental

Dada la heterogeneidad de ambientes y especies vegetales, se han descrito en la literatura mecanismos muy disímiles tanto para ajustar el balance de agua como para lograr un uso eficiente de la misma. Cuando el agua es limitante en el medio, se convierte en uno de los factores críticos de adaptación puesto que afecta tanto la dinámica del crecimiento y desarrollo, como la capacidad de responder frente a las adversidades del entorno (Munns, 2002; Claeys *et al.*, 2014).

En esta tesis se aborda la respuesta de la planta al estrés salino como estrategia experimental para entender el ajuste hidráulico de la planta y en particular el rol de la raíz en la tolerancia.

En las plantas, la condición de estrés salino⁴ es crítica dado que altera la homeostasis hídrica y la distribución de iones, afectando su supervivencia. La respuesta adaptativa para tolerar la salinidad interconecta tres aspectos claves: i) prevenir/reparar el daño (detoxificación), ii) re-establecer la homeostasis, tanto iónica como osmótica frente a las nuevas condiciones de estrés y iii) adaptar su tasa de crecimiento (Zhu, 2001; Munns & Tester, 2008; Shabala *et al.*, 2015). Los aportes de la biología molecular junto a los estudios de electrofisiología clásica han contribuido a enriquecer el conocimiento acerca de la participación de los canales iónicos en la tolerancia a la salinidad (Maathuis, 2006). El descubrimiento de las acuaporinas permite suponer que estos canales pueden también contribuir con la compartimentalización del agua intracelular tal como los canales iónicos contribuyen a la compartimentalización de los iones. Sin embargo, resta elucidar si las acuaporinas presentan un rol estratégico en el reajuste osmótico inducido por la situación de estrés.

⁴ La sal añadida desencadena una disminución del potencial hídrico del suelo al disminuir el componente osmótico del potencial del suelo.

Aumentar la salinidad del suelo es la situación experimental elegida para caracterizar la estrategia hidráulica desencadenada por la planta modelo *Beta vulgaris* para tolerar el tratamiento. Cuando el potencial hídrico del suelo (Ψ_{suelo}) se reduce, determina que se reduzca la diferencia entre el Ψ_{atm} y el Ψ_{suelo} , y por lo tanto el gradiente de potencial hídrico a lo largo del SPAC. Por analogía con la ley de Ohm, la primera suposición que se puede hacer es que en el instante en que la planta *sensa* la disminución del Ψ_s , experimenta una reducción del flujo de agua a través del organismo (J_v). En conjunto, estos dos eventos estarían involucrados en la modulación de la conductancia de la planta (K_{planta}), una medida de la capacidad de la planta para transportar agua por unidad de gradiente.

A diferencia de los circuitos eléctricos simples, una planta desencadena un conjunto de estrategias que le permiten modular tanto el flujo (J_v) como la conductancia (K_{planta}) ante el gradiente desfavorable ($\Delta\Psi_{hoja-suelo} = \Psi_{hoja} - \Psi_{suelo}$), modificando los tres parámetros de la Ley de Ohm. Esta ley describe un estado estacionario donde se supone K_{planta} independiente de las otras variables. En este contexto, la situación experimental resulta relevante para caracterizar las propiedades hidráulicas de la raíz y su participación en el movimiento de agua.

4. Las características de *Beta vulgaris* como modelo de estudio

Beta vulgaris es un miembro de la subfamilia de las Chenopodiaceae por lo que se considera una halotolerante (Clarke *et al.*, 1993) o glicófita moderadamente tolerante a la sal (Bartels *et al.*, 2013). En esta subfamilia de plantas, la disminución del potencial hídrico en el suelo desencadena un ajuste osmótico que permite sostener la turgencia y, por lo tanto, la capacidad de absorber agua desde el suelo (Koyro *et al.*, 2006). Este comportamiento entre las subespecies de remolacha está relacionado con su rápida capacidad de regulación y redistribución de agua y de iones (Daoud *et al.*, 2001; Ashraf *et al.*, 2008).

En este modelo experimental, el movimiento de agua a través de la vía radial se ha mostrado significativamente sensible a $HgCl_2$ y dado que se ha propuesto a este agente como inhibidor del pasaje de agua mediado por acuaporinas, la sensibilidad detectada supone que la vía celular participa como un componente clave en el transporte de agua de la misma (Amodeo *et al.*, 1999). Asimismo, la permeabilidad osmótica al agua (P_f) de la membrana plasmática de la raíz almacenadora es extremadamente alta, $542 \mu m s^{-1}$ y mostró sensibilidad (respuesta inhibitoria) a la

acidificación citosólica (Alleva *et al.*, 2006; Bellati *et al.*, 2010). Una fracción aislada de vesículas de tonoplasto de parénquima de raíz también mostró sensibilidad a pH así como a HgCl₂ (Amodeo *et al.*, 2002; Sutka *et al.*, 2005). Todas estas evidencias sugieren que la vía celular tendría una gran capacidad de transporte en la raíz de remolacha. En cuanto a las acuaporinas, sólo tres acuaporinas de membrana plasmática han sido descritas y caracterizadas: BvPIP1;1, BvPIP2;1 y BvPIP2;2 (Barone *et al.*, 1998; Barone, Shih & Wasserman, 1997; Bellati *et al.*, 2010; Jozefkowicz *et al.*, 2013; Qi, Tai & Wasserman, 1995; Skorupa-Klaput *et al.*, 2015). Estas tres acuaporinas son las más abundantes de acuerdo con la información disponible en las bibliotecas de EST⁵ y la información de transcriptómica disponible (Mutasa-Gottgens *et al.*, 2012). El genoma de la remolacha azucarera fue publicado recientemente (Dohm *et al.*, 2013), y desde el 2016, se encuentra disponible en las bases de datos de genoma⁶. En *Beta vulgaris*, la familia MIP cuenta con un total de 26 genes, y de estos 22 genes codificarían para putativas acuaporinas. Particularmente, en este conjunto las PIPs solo estarían codificadas por tres genes, mientras que los genes restantes codificarían para acuaporinas tradicionalmente localizadas en membranas intracelulares (http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v3_dicots/basic_search/result#download_genes).

En el laboratorio donde se ha desarrollado esta Tesis se dispone de estudios previos en relación a la tolerancia de *Beta vulgaris* a la salinidad en un sistema de cultivo hidropónico. Ante un cambio abrupto y de alta concentración de sales (Bellati, 2012; Tesis Doctoral FFYB), *Beta vulgaris vulgaris* (var. *Detroit*) desencadena una estrategia tolerante cuyo fenotipo se caracteriza en las primeras horas: a) cambios en el fenotipo turgente (**Figura 2**), b) modificación del estado hídrico, c) los niveles de expresión de las acuaporinas reportadas en la raíz no presentan modificaciones significativas (Vitali *et al.*, 2015).

⁵ EST es el acrónimo de “expressed sequence tag”.

⁶ Se encuentra disponible el proyecto de secuenciación en <http://bvseq.molgen.mpg.de/index.shtml>. En la plataforma <http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/> se puede comparar genomas de diferentes especies disponibles.

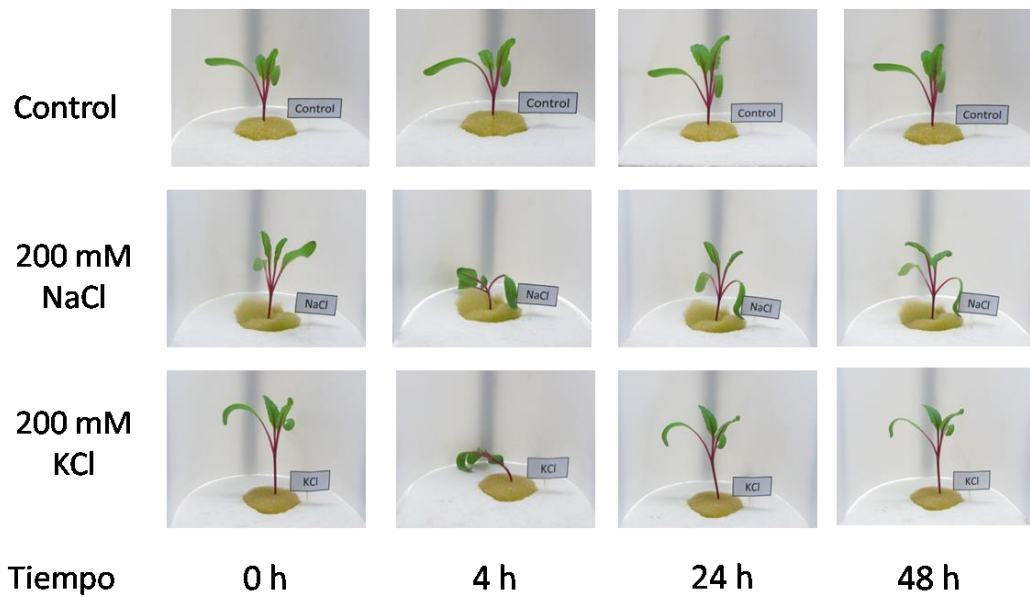


Figura 2: Respuesta de las plántulas de *Beta vulgaris* frente al incremento de la salinidad del medio de cultivo hidropónico por agregado de NaCl o KCl. En la tesis de Doctorado del Dr. Bellati se evaluó la modificación de los transcritos de las acuaporinas en este estadio de desarrollo. Se presenta la secuencia de fotografías obtenidas para una planta elegida al azar en cada condición. Al iniciar el período lumínico en la cámara, se modificó el medio de crecimiento de las plantas agregando NaCl o KCl en cantidad suficiente para generar una concentración de 200 mM final. Dentro de las primeras horas de tratamiento se observó una pérdida de turgencia, y la consiguiente recuperación después de 24 h desde el comienzo del tratamiento. Esta rápida capacidad de recuperación a un tratamiento abrupto evidencia las cualidades halotolerantes de *Beta vulgaris*. La implementación de KCl como estrategia alternativa se detalla en el Capítulo 1.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente Tesis se abordó el estudio de los ajustes hidráulicos de la raíz de *Beta vulgaris* con el objeto de evidenciar la participación de la vía celular en la modulación hidráulica a corto plazo. Dada la plasticidad⁷ de esta especie frente a la salinidad y los estudios previos disponibles, se abordó la caracterización hidráulica. Esta estrategia experimental permite por primera vez caracterizar el rango de modulación de las propiedades hidráulicas de la raíz necesario para lograr exitosamente el manejo del agua y electrolitos en la tolerancia a la salinidad.

⁷ Plasticidad es una cualidad de una planta en relación a una propiedad o al individuo completo tal que puede presentar un rango de fenotipos diferentes para un genotipo dado, de acuerdo al entorno en que se encuentra (Bradshaw, 1965; Weiner, 2004; Couso y Fernandez, 2012).

5. Hipótesis de trabajo

En *Beta vulgaris* -como planta modelo de halotolerancia- los mecanismos de regulación reversibles de la vía celular son esenciales en el ajuste hidráulico ante una condición de estrés salino en la raíz. De acuerdo con el modelo hidráulico descrito en las plantas, la capacidad de modulación en el corto plazo está asociada a un rango acotado. Los componentes del circuito hidráulico y su contribución en la respuesta a la salinidad pueden discriminarse modificando las condiciones de estrés, y analizando el rango de respuesta obtenida.

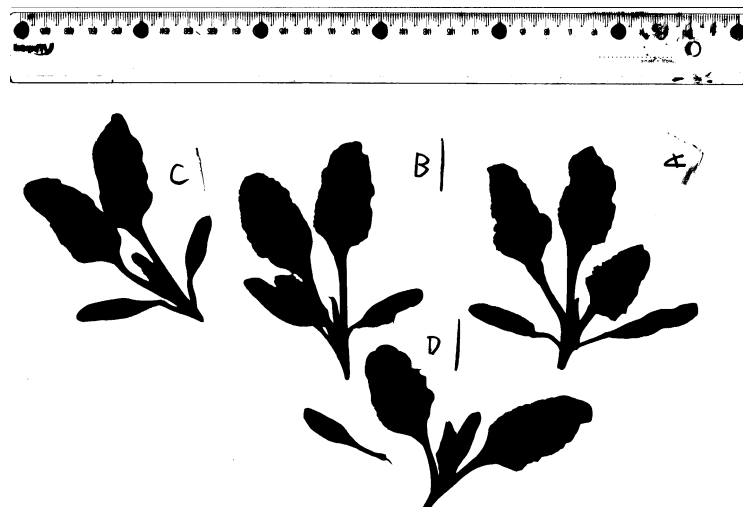
6. Objetivos generales

Para probar la hipótesis de trabajo se propuso evaluar: *i)* la contribución de la conductividad hidráulica de la raíz al manejo del agua de la planta en el cambio de fenotipo observado, *ii)* la participación de la vía celular en la modulación del ajuste hidráulico desencadenado, *iii)* la modulación de las propiedades hidráulicas del tonoplasto a partir de sus propiedades osmóticas.

En el primer capítulo se caracterizaron las propiedades hidráulicas asociadas a un cambio en el fenotipo turgente dentro de las 24 h de tratamiento. El eje de la caracterización fue *la modulación de las vías de entrada y salida de agua* a nivel de planta entera. En el segundo capítulo, el foco de los experimentos estuvo destinado a determinar el rango de modulación de las propiedades hidráulicas de *Beta vulgaris* ligadas a la *plasticidad de respuesta a corto plazo*. De esta forma, se intentó contextualizar la relevancia de la participación de la raíz en la respuesta a la tolerancia a la salinidad. En el tercer capítulo, se procedió a determinar la *dinámica de ajuste* de la permeabilidad al agua del tonoplasto como elemento integral de la vía celular de la raíz de *Beta vulgaris*. La elección del tonoplasto tiene como finalidad indentificar dentro de la vía celular la participación de las membranas internas más allá de la contribución del simplasto.

Capítulo 1

Caracterización de las propiedades hidráulicas de *Beta vulgaris* en la tolerancia al estrés salino



Introducción

En conjunto, las plantas funcionan como sistemas hidráulicos que han sido especialmente diseñados para hacer uso del agua y garantizar su desarrollo. Ante una situación desfavorable, déficit de agua en el suelo o exceso de sales, se ha observado que una de las estrategias más conservadas de las plantas es reducir la conductancia estomática (g_s) y así evitar la pérdida de agua (Munns & Tester, 2008). La raíz es el principal órgano involucrado en la absorción de agua e incorporación de nutrientes en la planta. Si bien es un órgano en el que han sido propuestos e identificados las vías de conducción que contribuyen al movimiento de agua, no se ha discutido cuál es su contribución al ajuste hidráulico del sistema representado por la planta en su conjunto.

1. La modulación del flujo de agua en las raíces

En las raíces, las estrategias involucradas en la modulación del flujo de agua desde el suelo hacia la vasculatura pueden combinar cambios anatómicos y/o arquitectónicos además de la modulación de la permeabilidad al agua de las membranas (Hachez *et al.*, 2006; Maurel *et al.*, 2010; Chaumont *et al.*, 2014). Este conjunto de mecanismos afectan directamente la capacidad de la raíz para transportar agua denominada en la literatura como conductividad hidráulica de la raíz, L_{pr} (Tyree, 2003). El modelo compuesto, como se detalló en la *Sección Introducción*, describe dos caminos para el movimiento de agua a través de la raíz. En la vía apoplástica o apoplasto, el flujo de agua se distribuye a lo largo de los espacios intercelulares promovido por el gradiente de potencial de presión (Ψ_p) entre el suelo y la vasculatura, por lo que está fuertemente afectado por las modificaciones en el potencial hídrico de la vasculatura y/o del medio externo. La modificación del flujo de agua a través del apoplasto está directamente limitado por la barrera física que se forma por deposición de suberina en la exodermis y/o endodermis (Taleisnik *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 2000). La suberización en la endodermis dada su hidrofobicidad determina que se reduzca el flujo de agua entre los espacios celulares (Schreiber *et al.*, 2005; Naseer *et al.*, 2012). En cambio, en la vía celular el agua se distribuye a través de una vía más resistiva que involucra el ingreso del agua a las células atravesando las membranas celulares. En este último camino la fuerza impulsora que promueve el movimiento de agua no es solo la diferencia de potencial de presión (Ψ_p) sino también la diferencia de presión osmótica (Ψ_π) mediada por las características de las membranas. Recientemente se ha reportado que las acuaporinas no solo pueden ser moduladas reversiblemente por la acidificación

citoplasmática, los niveles de calcio o la presencia de compuestos mercuriales sino que también su relocalización entre membranas internas es crucial en los tratamientos salinos (Boursiac *et al.*, 2005; Casado-Vela *et al.*, 2010; Horie *et al.*, 2011; Luu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

2. La tolerancia al estrés salino

El concepto de estrés en las plantas está íntimamente relacionado a la tolerancia. Cualquier agente que determina un efecto desfavorable sobre el individuo puede denominarse agente estresante y, la tolerancia es el concepto ligado a la eficiencia de la planta para lidiar con las adversidades que le impone el medio ambiente (Taiz & Zeiger, 2015). Una de las consecuencias de la presencia de altas concentraciones de sal en el suelo es la reducción de su potencial hídrico dificultando la absorción de agua por las raíces. El déficit hídrico desencadenado ante el aumento de la salinidad afecta gravemente la tasa de crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos, especialmente en aquellos suelos enriquecidos en ion Na^+ . El mecanismo de toxicidad de este ion involucra la acumulación del catión en los tejidos dado que ingresa a la planta por su similitud con el K^+ .

Se propone que el estrés salino se caracteriza por dos fases, una primera fase osmótica seguida de una fase iónica o dependiente del ión (Munns & Tester, 2008). El efecto osmótico sobre la planta desencadena en pocos minutos modificaciones en el crecimiento y cierre de los estomas como consecuencia de la modificación en las relaciones hídricas en la planta (Munns, 2002). La segunda fase requiere más tiempo, en esta etapa el ión involucrado en el estrés y su redistribución a lo largo de la planta son los responsables de la senescencia temprana. Se ha demostrado que esta fase es a su vez dependiente de hormonas y de los mecanismos de señalización de la raíz (Munns *et al.*, 2000). Una de las principales hormonas relacionadas con la respuesta al estrés hídrico es el ácido abscísico (ABA), que participa además en la señalización cruzada entre la raíz y las hojas en las plantas. Las vías de señalización y modulación entre la parte aérea y la raíz para esta hormona (ABA) han sido ampliamente caracterizadas a nivel genético y bioquímico (Finkelstein, 2013; Geng *et al.*, 2013; Mittler & Blumwald, 2015). Esta segunda fase, puede desencadenar un efecto nocivo sobre las células incluso como ventaja adaptativa de la planta para la supervivencia (Ismail *et al.*, 2014).

La tolerancia a la salinidad está conformada por múltiples aspectos dentro de la planta, que tradicionalmente se han caracterizado por separado para simplificar la aproximación experimental (Negrão *et al.*, 2016). En este contexto, el objetivo de esta

Tesis es enfocarse en integrar las propiedades hidráulicas asociadas a la tolerancia y plasticidad de *Beta vulgaris*.

3. Antecedentes

En el caso de *B. vulgaris*, el conjunto de resultados previos disponibles en el laboratorio sugiere que la vía celular contribuye significativamente a la modulación del transporte de agua en la raíz (Ver Sección Introducción general). Dentro de los resultados obtenidos se determinó que las plantas de remolacha al ser transferidas a un medio suplementado con niveles de salinidad elevados (200 mM NaCl) presentan un fenotipo caracterizado por una fase rápida de pérdida de turgencia (< 1 h) seguida de una recuperación al estado turgente (después de 24 h) aún cuando permanecen en el medio de potencial desfavorable ($\Psi_{medio} = -0,90$ MPa) (Bellati, 2012). Por lo tanto, la remolacha es un excelente modelo para evaluar los ajustes hidráulicos asociados a la tolerancia a la salinidad en el corto plazo.

4. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue un sistema de cultivo hidropónico donde el incremento de la salinidad del medio produce un déficit hídrico en el SPAC. Se caracterizó específicamente la primera fase de la respuesta desde el inicio del tratamiento hasta la recuperación del fenotipo turgente (24 h). El potencial hídrico (Ψ_{medio}) del medio fue alterado por suplementación con NaCl o con KCl en concentración equivalente a 200 mM en ambos casos. La introducción del tratamiento con KCl tuvo por objetivo introducir un catión monovalente alternativo. Reportes previos en trigo han demostrado que el efecto osmótico que desencadena el NaCl en el vástago es el mismo que el KCl: una inmediata reducción de la conductancia estomática (g_s) en conjunto con otros parámetros asociados a la fase osmótica del estrés (Rahnama *et al.*, 2010, 2011). No se dispone de resultados en relación a los efectos sobre la raíz de estos distintos tratamientos. En la literatura las evidencias permiten suponer caminos diferentes para la recirculación de estos dos cationes a lo largo de la planta: el Na^+ se redistribuye a través de los espacios intercelulares (Niu *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 2004; Karley & White, 2009) mientras el K^+ está fuertemente vinculado a la estabilidad del potencial de membrana y al movimiento transcelular mediado por transportadores de membrana (Tester & Davenport, 2003; Shabala & Cuin, 2008, 2010; Karley & White, 2009; Gajdanowicz *et al.*, 2011). Es evidente que la discriminación entre estos cationes es atribuible a la especificidad de las membranas. Aquí, se propuso utilizar ambos tratamientos para

evidenciar en el ajuste hidráulico la relevancia de la selectividad de las membranas y su manejo del estado hídrico en la raíz.

5. Objetivo general

Caracterizar las propiedades hidráulicas de *Beta vulgaris* en los dos tratamientos salinos durante la fase inicial de respuesta en que se produce un cambio de fenotipo.

Objetivos específicos

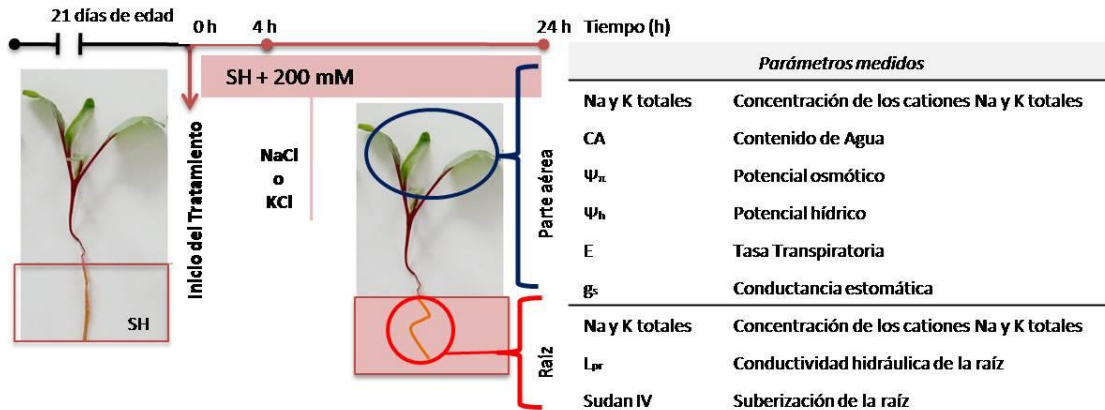
- Caracterizar el estado hídrico de las plantas de *Beta vulgaris* bajo los dos tratamientos
- Caracterizar las propiedades hidráulicas de *Beta vulgaris* en el cambio de fenotipo ante los dos tratamientos salinos
- Caracterizar las propiedades hidráulicas de *Beta vulgaris* después de suspendido el tratamiento
- Evaluar la contribución de la vía celular en el ajuste hidráulico

Descripción del protocolo utilizado en este Capítulo

El protocolo consistió en someter a las plantas cultivadas en el sistema de hidroponía, durante 21 días, a tratamientos con 200 mM de KCl o de NaCl. La reducción del potencial hídrico (Ψ_{suelo}) del medio mediante el agregado de las sales afectó la fuerza impulsora que promueve el ingreso de agua a la planta. Esta estrategia se implementó para evaluar las propiedades hidráulicas y la selectividad de los mecanismos asociados a los dos cationes probados a lo largo del tiempo (0 - 24 h). En una segunda fase se evaluó la respuesta de las plantas después de la suspensión de los tratamientos de 4 h y 24 h. En estas plantas se caracterizó el estado hídrico y las propiedades hidráulicas de acuerdo a como se esquematiza en la **Figura 3**.

Diseño Experimental

A.



B.

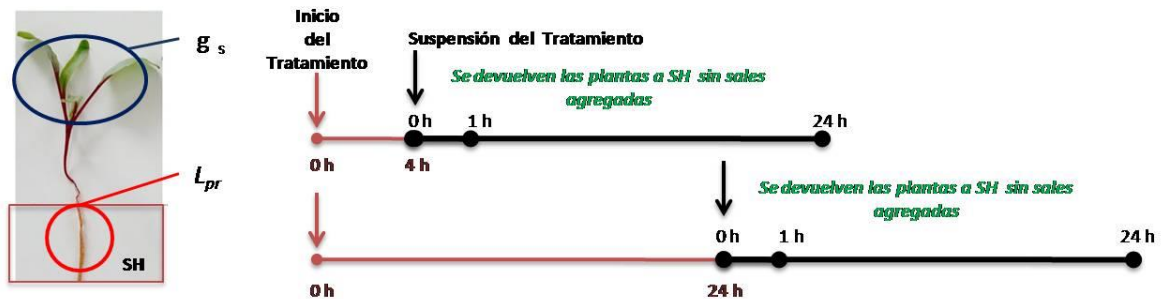


Figura 3: Breve descripción del diseño experimental y metodología aplicada en este Capítulo.

En todos los experimentos se utilizaron plantas de remolacha de 21 días de edad cultivadas en el sistema hidropónico con solución Hoagland modificada (SH, composición en la [Tabla 7](#)). **A.** El tratamiento salino se realizó agregando a la SH la masa de NaCl o KCl suficiente para generar una concentración final en la solución del medio de 200 mM. Se mantuvieron las plantas bajo tratamiento salino durante 24 h. A lo largo de este tiempo (0 h, 4 h, y 24 h) se procedió a determinar en las plantas el estado hídrico midiendo los parámetros indicados en esta **Figura**. En todos los experimentos independientes, un conjunto de plantas se mantuvo en la SH sin suplementar con sales, como control del experimento sin tratamiento. La disminución de potencial hídrico del medio en que se encuentran las plantas mediante el agregado de las sales fue la estrategia implementada para caracterizar las propiedades hidráulicas en este modelo vegetal, así como las asociadas a cada catión. En el vástago de las plantas de *Beta vulgaris* se determinó: i. Na^+ y K^+ totales; ii. CA: contenido de agua de la hoja; iii. Ψ_{π} : potencial osmótico de la hoja; iv. Ψ_h : potencial hídrico en la hoja; v. E: tasa transpiratoria foliar; vi. g_s : conductancia estomática. En las raíces de *Beta vulgaris* se determinó: vi. Na^+ y K^+ totales; vii. L_{pr} : conductividad hidráulica de la raíz; viii. La suberización del apoplasto (cualitativamente). **B.** En una segunda etapa se analizaron las propiedades hidráulicas en las plantas que habían estado bajo el tratamiento y fueron restauradas a la Solución Hoagland (SH). Esta estrategia apuntó a evaluar la capacidad de conducción en que se encontraron las plantas después de haber estado sometidas durante 4 h o 24 h de tratamiento salino. En todos los experimentos independientes se procedió a tener un grupo de plantas control donde no se había agregado sal al medio, y un grupo de plantas bajo tratamiento donde no se suspendió el tratamiento. Se midieron las dos principales propiedades hidráulicas (L_{pr} y g_s) durante las 24 h siguientes a la suspensión del tratamiento para evaluar la capacidad de recuperación de estas propiedades.

Resultados

1. Caracterización del nuevo estado hídrico en las plantas de *Beta vulgaris* en condiciones de tratamiento salino: la transición de fenotipo

Se verificó que la suplementación del SH con los agentes iónicos (NaCl o KCl, 200 mM) desencadena una respuesta compatible con la reportada para una planta halotolerante perteneciente a la familia de las Chenopodiaceae (Shabala, 2013; Taiz & Zeiger, 2015): a) enlentecimiento del crecimiento y b) reajuste osmótico.

A partir de las fotografías obtenidas del área foliar, se observó un significativo enlentecimiento de la tasa de crecimiento relativo (TCR) en las plantas que habían sido tratadas con alguna de las dos sales respecto de aquellas en medio control. La pendiente de la curva de área relativa en función de tiempo es significativamente mayor para las plantas en SH ($p < 0.0001$), respecto a la obtenida para los tratamientos (**Figura 4 A**). No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con NaCl y el de KCl, asimismo ambos fueron significativamente diferentes respecto a cero ($p < 0.005$) lo cual es compatible con la respuesta de una planta halotolerante. En este contexto, la respuesta observada correspondió a la fase osmótica propuesta para las plantas afectadas por un tratamiento salino donde la respuesta inmediata es modificar el crecimiento (Munns & Tester, 2008).

A diferencia de lo observado en el área foliar, la distribución de la biomasa estimada a partir de la razón entre vástago/raíz resultó en todos los casos independiente tanto del tratamiento como del tiempo a lo largo del ensayo (**Figura 4 B**). La modificación del crecimiento promovida por el agregado de sales a SH afectó por igual tanto al vástago como a la raíz. Este parámetro fue evaluado tanto en función del peso fresco como del peso seco para determinar si la variación en el contenido de agua de los órganos determinaba algún sesgo. Independientemente de la base sobre la que se determinó esta razón, no se observaron diferencias entre tratamientos.

Al duplicar el tiempo de tratamiento, en las plantas no se observaron efectos tóxicos y las plantas mantienen el fenotipo turgente. Se analizó la relación vástago/raíz en experimentos donde las plantas permanecieron en la SH suplementada por el doble de tiempo (96 h). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (SH+NaCl; o SH+KCl) y las plantas en el medio control (SH) en cuanto al desarrollo del área foliar (**Figura 4 C**), y respecto al desarrollo radical (**Figura 4 D**). Después de 96 h de tratamiento, la razón entre el peso seco del vástago y la raíz resultó equivalente entre las plantas control y las que crecieron en el medio suplementado con NaCl o KCl, si bien numéricamente superior a la de las plantas

tratadas por 48 h (**Figura 4 E**). Aunque no se observaron diferencias significativas, existe una tendencia en las plantas tratadas con NaCl a presentar una mayor área foliar por unidad de masa radical. En cambio, en las plantas tratadas con KCl el tratamiento no produce este efecto.

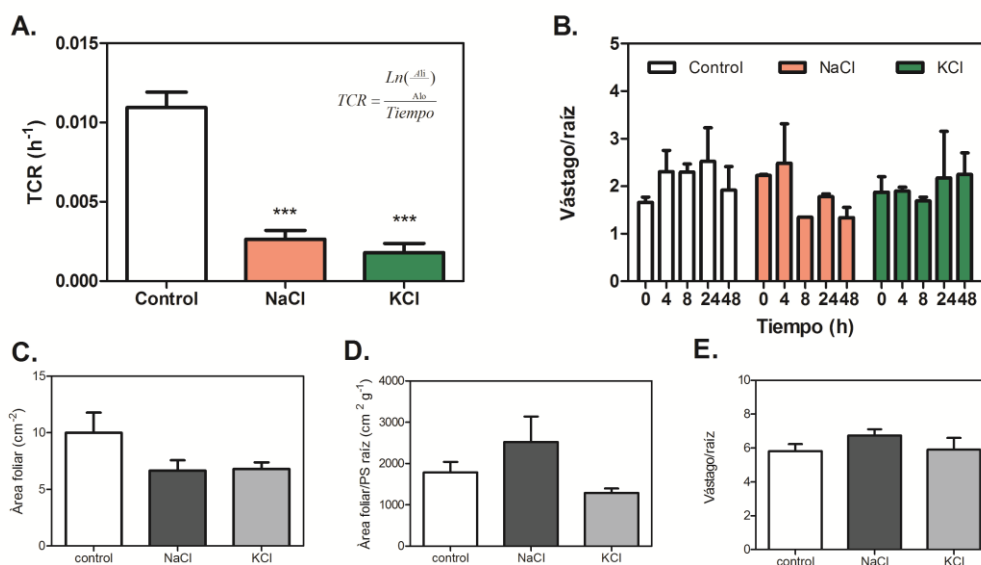


Figura 4: Efecto del tratamiento en el crecimiento de las plantas de remolacha. **A.** La tasa de crecimiento relativo del área foliar (TCR). Las barras representan el TCR para condición ensayada, siendo el producto de $n: 4$ réplicas biológicas independientes, los valores corresponden a media \pm SEM. *** Indica que las medias de los tratamientos son significativamente diferentes de cero (Test de Student, $p < 0.001$). **B.** La razón entre vástago y raíz a partir del peso seco de las muestras, representada por barras a los distintos tiempos del ensayo. No hay diferencias significativas entre los tratamientos, se presenta la media \pm SEM; $n: 3$ experimentos independientes). **C.** Área foliar de plantas sometidas a 96 h de tratamiento (4 días). **D.** Área foliar por unidad de peso seco de raíz de plantas sometidas a 96 h de tratamiento (4 días). **E.** Razón vástago/raíz en plantas sometidas a 96 h de tratamiento (4 días). En **C**, **D** y **E**, se presentan la media \pm SEM, resultado de $n: 5-6$ experimentos independientes.

De acuerdo a lo reportado anteriormente para este sistema experimental, en las plantas de remolacha se redujo significativamente el contenido relativo de agua (CRA) y en el potencial hídrico (Ψ'_h) ante los tratamientos aplicados (Vitali *et al.*, 2015). El incremento de la salinidad determinó una reducción significativa del CA (Anova de dos vías, post-test de Bonferroni, $p < 0.05$) en la hoja de las plantas tratadas respecto a los valores presentados por las plantas control (0.935 ± 0.005). Es relevante mencionar que estas modificaciones en el contenido de agua de las hojas en las plantas bajo el tratamiento salino resultaron inferiores en un 2% respecto de las plantas control (**Figura 5 A**). La recuperación del fenotipo turgente no se reflejó en los valores de estos parámetros a lo largo del ensayo, es decir, no se observó un incremento de CA cuando el fenotipo era turgente. Se calculó a partir de los valores del potencial osmótico de la hoja (Ψ_{osm}) -**Tabla 1-**, el potencial turgente (Ψ'_p)

correspondiente. Esta propiedad de la hoja presentó un decrecimiento marcado en las primeras horas, seguido de una tendencia a la recuperación que alcanza valores semejantes a los de las plantas control después de 48 h de tratamiento (**Figura 5 B**). Por lo tanto, las modificaciones en el fenotipo turgente presentaron una relación directa con las modificaciones medidas en el Ψ_{osm} de la hoja. En la **Figura 5 C**, se puede observar que los valores calculados de Ψ'_p no presentaron una correlación con las mínimas variaciones en el contenido de agua. Se verificó que el incremento de salinidad en el suelo durante los tratamientos desecandena un reajuste osmótico en las plantas de *Beta vulgaris*. Los dos tratamientos salinos aplicados desencadenaron respuestas equivalentes en la parte aérea.

Tabla 1: Potencial osmótico (Ψ_{osm} , medido en MPa) determinado a partir de la savia de la hoja a lo largo del ensayo. Se presenta la media \pm SEM de n=3 experimentos independientes. Las celdas grises indican aquellas determinaciones significativamente diferentes del control ($P < 0.05$; test de Bonferroni).

Tiempo (h)	0	4	8	24	48
Control	-0.717 \pm 0.012	-0.717 \pm 0.015	-0.754 \pm 0.015	-0.744 \pm 0.012	-0.667 \pm 0.026
NaCl	-0.715 \pm 0.014	-0.745 \pm 0.022	-0.809 \pm 0.026	-0.904 \pm 0.098	-1.178 \pm 0.078
KCl	-0.722 \pm 0.008	-0.802 \pm 0.015	-0.831 \pm 0.041	-0.950 \pm 0.067	-1.174 \pm 0.084

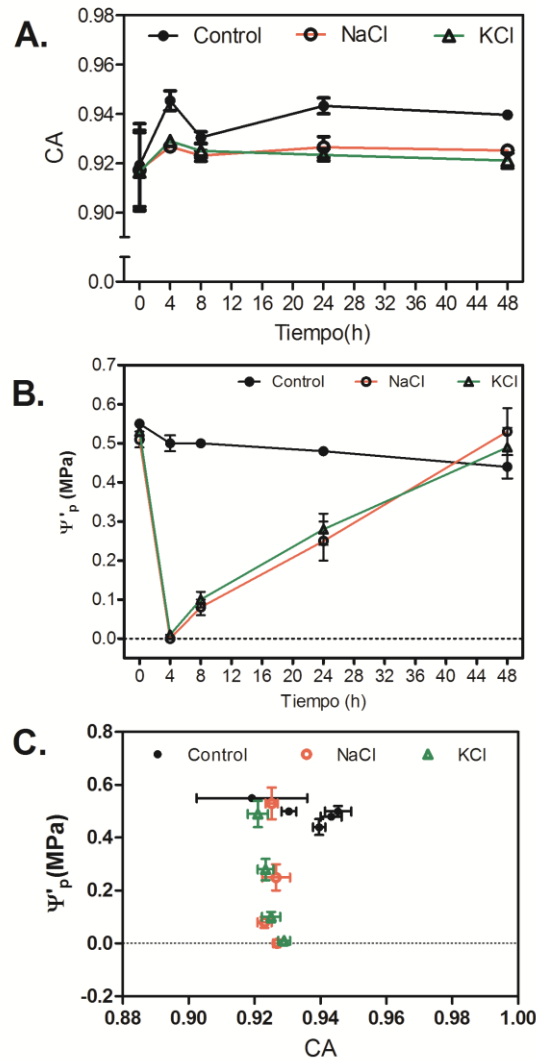


Figura 5: Efecto del tratamiento en el estado hídrico de las plantas de remolacha. A. Contenido de agua (CA) de las hojas medidas en las plantas a lo largo del tratamiento. **B.** El cambio del fenotipo observado presentó modificaciones del potencial turgente, Ψ'_p , calculado en las hojas de las plantas a lo largo del tratamiento, a expensas de la modificación del potencial osmótico. **C.** Representación gráfica del Ψ'_p en función de CA. En todos los casos se presenta la media \pm SEM de un total de n: 3 experimentos independientes.

A fin de corroborar si el ajuste osmótico medido se encontraba ligado a una redistribución de sales como en otras especies vegetales (Tester & Davenport, 2003), se procedió a determinar la concentración total de los cationes⁸ involucrados en el tratamiento. La relación entre los cationes (Na / K) en las plantas cultivadas en SH sin agregado de sales, presentó valores inferiores a 0.1 tanto en las hojas como en la raíz (**Figura 6**). En condiciones control, en ambos órganos el Na^+ almacenado fue

⁸ Dado que emisión atómica por fotometría de llama fue la metodología utilizada, y que no discrimina entre los estados de oxidación de los elementos, se informa la concentración total libre del metal presente en la muestra mineralizada aunque se utilice como simbología el estado de catión.

igual o inferior al 10 % de la masa de K^+ , así se verificó que los niveles de K^+ superan a los de Na^+ como en otras especies vegetales. La relación entre ambos cationes no presentó diferencias significativas en las plantas control a lo largo del tiempo del tratamiento. En cambio, en las plantas bajo el tratamiento salino, la suplementación de SH con NaCl determinó un incremento significativo en la relación Na / K tanto en la hoja como en la raíz respecto de las plantas control después de 24 h de tratamiento (**Figura 6 A y B**). Este resultado podría atribuirse a una contaminación en las raíces, dada la composición de la solución que está en contacto con este órgano. Dado que en las hojas se observó el mismo comportamiento; y que en las raíces provenientes del tratamiento con KCl no se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo respecto de las plantas control, la posible contaminación fue descartada. En el tratamiento con KCl, la relación Na / K no presentó diferencias significativas respecto a las condiciones control. Al igual que en diferentes especies de remolacha y otras especies vegetales (Ghoulam *et al.*, 2002), ante los tratamientos salinos el contenido de K^+ no presentó diferencias significativas a lo largo del ensayo mientras que se observó un incremento de la concentración de Na^+ (**Figura 38**, Anexo). Por lo tanto, las modificaciones medidas en la relación entre estos cationes pueden atribuirse a la incorporación de Na^+ dentro de la planta. A partir de este resultado se verificó que la recirculación de los cationes utilizados fue diferente según el tipo de catión, por ende el *sensado* de las plantas de remolacha se considera diferente para cada uno de los dos tratamientos aplicados.

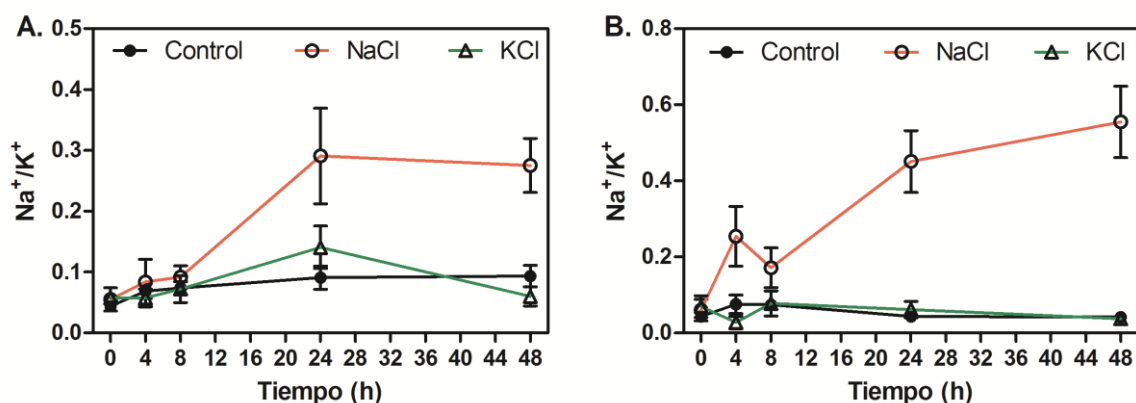


Figura 6: Relación entre la concentración de Na^+ , y la de K^+ , en las plantas a lo largo del tratamiento. Se procedió a mineralizar las muestras de tejido en mufla y determinar en las cenizas la concentración de los respectivos cationes por fotometría de llama. **A.** Determinación de la relación Na^+ / K^+ en las hojas. **B.** Determinación de la relación Na^+ / K^+ en las raíces. Se presenta la media de n: 2 experimentos independientes, donde cada muestra contiene la masa de dos plantas (cada condición en cada experimento se tomó por duplicado).

2. Caracterización de las propiedades hidráulicas de la planta asociadas al cambio de fenotipo turgente observado durante el tratamiento

Al reducir el potencial hídrico del medio por el agregado de sales, el gradiente de potencial hídrico a lo largo del SPAC se reduce. En la tolerancia se ve comprometido no sólo el gradiente de potencial hídrico, sino que desencadena una estrategia donde se reduce marcadamente la conductancia estomática en la parte aérea. ¿Qué relevancia tienen estas dos respuestas en el marco de ajuste hidráulico de la planta? ¿Cómo repercute el cambio de gradiente en la entrada de agua a través de la raíz?

2.1. Estrategia de la parte aérea de la planta de *Beta vulgaris*

Se caracterizó la pérdida de agua en las plantas sujetas al tratamiento a través de la determinación gravimétrica de la tasa transpiratoria (E) y la conductancia estomática de la hoja (g_s).

En la **Figura 7 A**, se presenta la variación del peso a lo largo de las primeras diez horas desde el inicio del tratamiento (tiempo 0 h). La pérdida de agua asociada a la tasa transpiratoria determina el decrecimiento del peso medido. El cambio de peso registrado en las plantas control (círculos blancos) fue mayor al de las plantas bajo tratamiento salino. No se observaron diferencias significativas entre los cationes involucrados en el estrés. La estrategia desencadenada por las plantas de *Beta vulgaris* inmediatamente afectó la masa de agua perdida a través del vástago. A partir de las determinaciones de peso en función del tiempo y el área foliar, se estimó la tasa transpiratoria (E) en estas plantas para cada día (**Figura 7 B**). La aplicación del tratamiento determinó una reducción del 50 - 70 % de E respecto a los niveles presentados por las plantas control. Incluso después de 72 h de tratamiento (día 3), E fue significativamente menor en las plantas bajo tratamiento salino ($< 0.10 \text{ g h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) respecto de los valores reportados por las plantas en medio control (SH). En ambos casos la reducción en el flujo de agua transpirado no presentó diferencias significativas entre los tratamientos iónicos aplicados.

Se evidenció que entre el primer día de tratamiento y el segundo día de tratamiento no existieron diferencias en E a pesar de las diferencias observadas en el fenotipo. Dada las características del método utilizado para medir E , no fue posible distinguir si durante la primera fase del tratamiento (4 h) existía algún efecto diferencial entre tratamientos y las plantas en solución SH (Vease *Tasa transpiratoria (E) en Materiales y Métodos*).

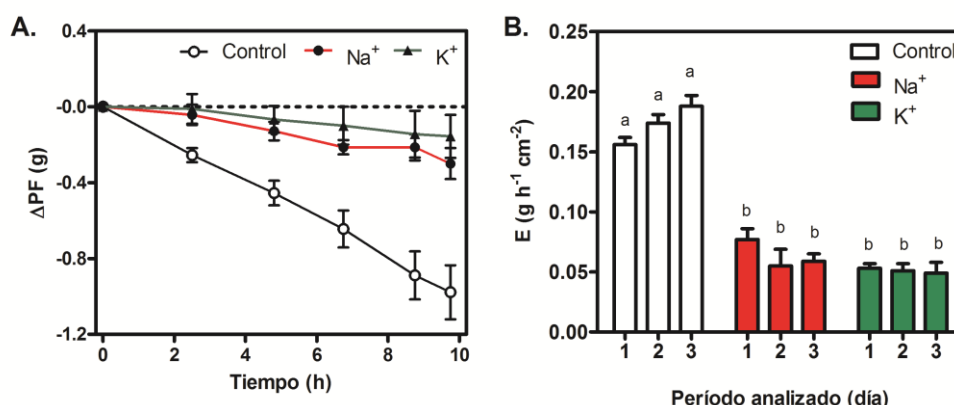


Figura 7: Caracterización de la pérdida de agua asociada a la transpiración en las plantas de *Beta vulgaris*. **A.** Disminución del peso de las plantas (ΔPF) en función del tiempo. Una vez aplicado el tratamiento (tiempo 0 h) se determinó la variación del peso fresco (ΔPF) de los contenedores con una planta cada uno durante 10 h por día. En las plantas tratadas tanto con NaCl (círculo negro) como con KCl (triángulo negro) la pérdida de peso en función del tiempo fue notoriamente menor que la observada en las plantas control (círculo blanco). **B.** Tasa transpiratoria (E) de las plantas de *Beta vulgaris* estimada a partir de la disminución del peso medido. En este caso, el tratamiento se clasificó en tres períodos: día 1 (inicio del tratamiento), el día 2 (segundo día de tratamiento) y el día 3 (tercer día de tratamiento). Se presentan la media \pm SEM de un total de 7 experimentos independientes, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$, Tukey).

La conductancia estomática (g_s) es la propiedad de las hojas que estima la apertura de los estomas a través de la determinación del vapor de agua eliminado a través de la hoja y constituye el principal elemento resistivo en la parte aérea a lo largo del SPAC (Sack & Holbrook, 2006). Se determinó en las plantas la conductancia estomática (g_s) a lo largo del ensayo con el objetivo de discriminar si en los fenotipos observados (4h o 24 h de tratamiento) la apertura estomática se modificaba junto con los cambios en el fenotipo, poniendo de esta manera en evidencia diferentes estrategias hidráulicas.

En las plantas de *Beta vulgaris* cultivadas en solución Hoagland (SH: control) la conductancia estomática (g_s) fue de 107.4 ± 4.19 mmol m⁻² s⁻¹. El valor medio obtenido para el conjunto de plantas determinadas no presentó diferencias significativas en los valores de g_s determinados a lo largo del día (**Figura 8 A**). En las plantas afectadas por el tratamiento los valores de g_s se redujeron en la primera hora (**Figura 8 A**) después de aplicado el tratamiento. Este resultado corroboró que la reducción de la pérdida de agua a través de la parte aérea es inmediata como se había postulado a partir de la determinación de la disminución del peso registrada gravimétricamente (**Figura 7 A**).

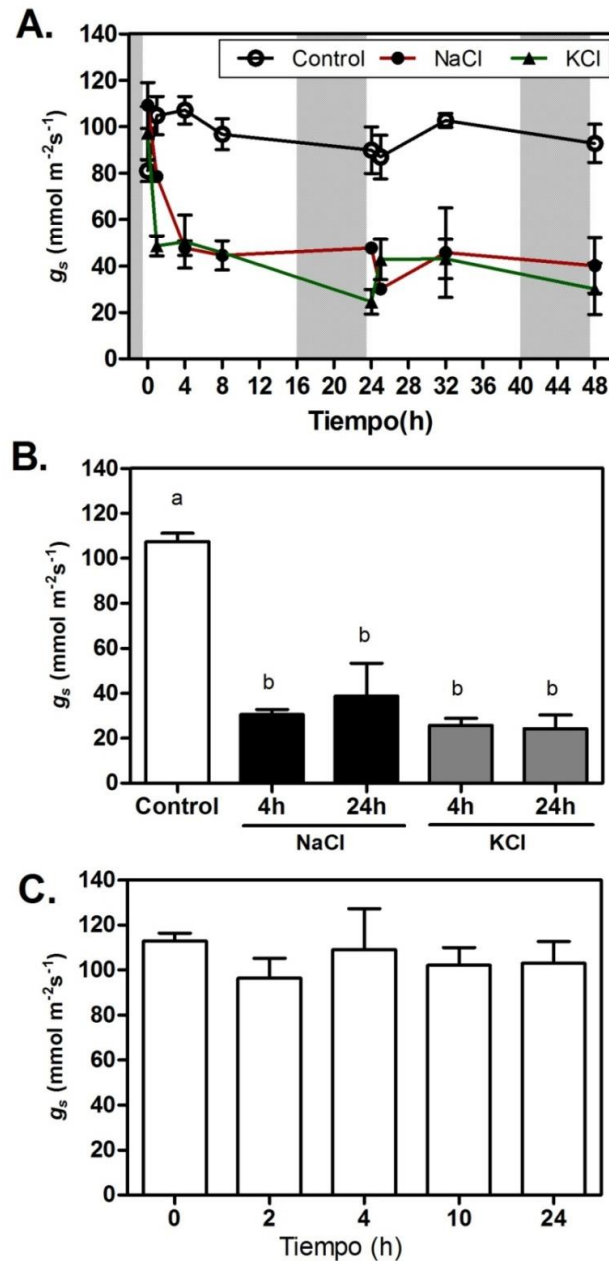


Figura 8: Caracterización de la conductancia estomática (g_s) en *Beta vulgaris*. **A.** Se representa el resultado de un experimento tipo donde se registró la conductancia estomática (g_s) de las plantas de *Beta vulgaris* a lo largo del ensayo. Se promediaron las respuestas de 5 plantas por condición: control (SH, círculo vacío con línea negra), NaCl (SH+NaCl, círculo negro con línea colorada), o KCl (SH+KCl, triángulo negro con línea verde). En gris se indica el período de tiempo que corresponde al apagado de las luces en la cámara de crecimiento. **B.** Los diferentes fenotipos observados a las 4 h y 24 h de tratamiento, presentaron un g_s menor al determinado en las plantas control (barra blanca). No se observaron diferencias entre las plantas tratadas durante 4 h y 24 h en ninguno de los tratamientos ni entre los tratamientos. Se representó la media \pm SEM de un total de 6 experimentos independientes, las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$, test de Bonferroni). **C.** Se representa g_s promedio de las plantas control en distintos momentos del día. No se observan diferencias significativas entre las distintas horas del día a las que se midió g_s en la cámara de crecimiento ($p < 0.05$, test de Bonferroni).

Después de 4 h de aplicado el tratamiento g_s se redujo al (23 ± 7) % respecto de la g_s medida en las plantas en el medio control (SH). La identidad de los cationes involucrados no afectó significativamente la reducción de este parámetro, tanto las plantas sujetas al tratamiento con NaCl como con KCl presentaron la misma inhibición (**Figura 8 B**). Esta reducción se mantuvo sin diferencias significativas incluso después de 24 h de tratamiento a pesar del cambio de fenotipo observado (**Figura 8 B**). La importancia que tiene g_s para la fotosíntesis es crítica y se ha reportado su dependencia con el horario del día (variación o ritmo circadiano) (Farquhar *et al.*, 1982; Lawson *et al.*, 2014). En las condiciones de crecimiento donde se desarrollaron los experimentos el promedio de g_s en las plantas control no mostró diferencias significativas respecto a otros horarios durante los que se mantienen encendidas las luces (ciclo diurno) de la cámara de crecimiento. La explicación más plausible es que la variabilidad biológica de la muestra de plantas utilizadas en los sucesivos experimentos independientes realizados (**Figura 8 C**) fue una fuente de dispersión superior a la variación diurna asociada al ritmo circadiano. Por ello para evaluar el efecto del tratamiento resultó equivalente comparar g_s de cada tratamiento con un valor medio de g_s de las plantas control al inicio del tratamiento.

2.2. Estrategia de la raíz de la planta de *Beta vulgaris*

Dada la importancia de la raíz como órgano involucrado en la entrada de agua y minerales hacia el interior de la planta, se caracterizaron las propiedades hidráulicas en las condiciones experimentales propuestas.

a. Determinación de L_{pr}

En las plantas control, cultivadas en SH, L_{pr} presentó un valor de (72.3 ± 21.1) $mL\ g^{-1}h^{-1}MPa^{-1}$. No se observaron diferencias significativas a lo largo del día entre los valores medios de L_{pr} medidos, compatible con la falta de variación observada en las determinaciones de g_s . Al igual que lo reportado en la sección anterior para g_s , la variabilidad biológica de las muestras es la fuente más probable de la dispersión de los valores medios obtenidos para cada momento del día. Después de iniciado el tratamiento, L_{pr} se redujo entre un 70 y un 86 % en las plantas tratadas con NaCl o KCl, aproximadamente. Ambos tratamientos salinos inducen un rápida e indistinguible disminución de L_{pr} . A pesar de las diferencias observadas en el fenotipo entre las 4 h y 24 h de tratamiento, L_{pr} no fue significativamente diferente (**Figura 9 A**).

Dada la elevada osmolalidad de la SH suplementada, el gradiente osmótico del medio podría estar afectando la determinación de L_{pr} . Se analizó si los valores de L_{pr} podían estar asociados a un gradiente desfavorable provocado por los iones del medio circundante. Se realizaron dos controles: i. la determinación de P_o ; ii. La determinación de la capacidad de transporte en presencia y en ausencia de sales en la misma planta.

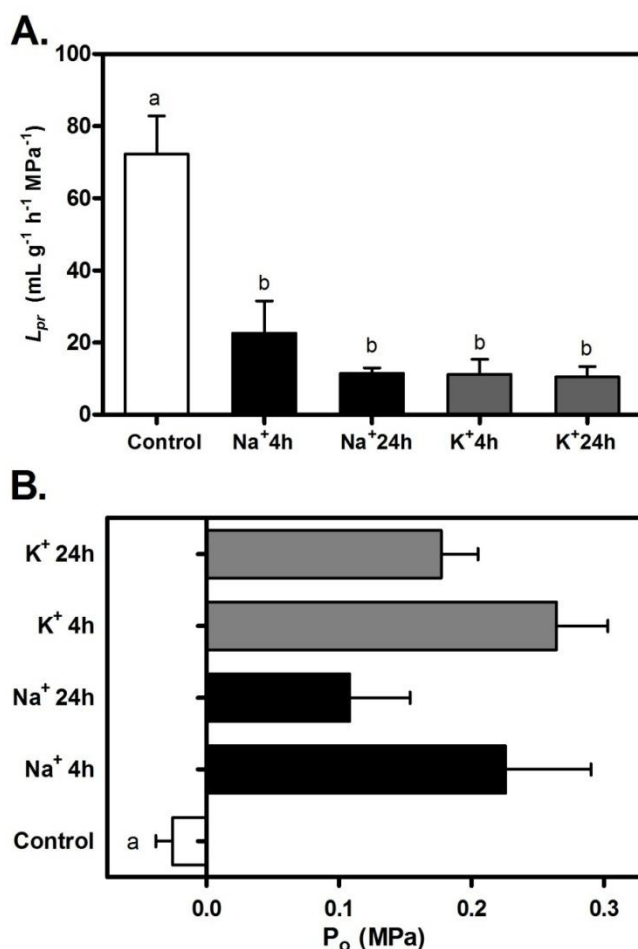


Figura 9: Caracterización de las propiedades hidráulicas de las raíces de *Beta vulgaris* bajo tratamiento salino. Utilizando la cámara de Scholander se evaluó la capacidad para conducir agua a través de la raíz. **A.** La eficiencia de transporte asociada a la determinación de L_{pr} se redujo significativamente en las plantas que habían sido tratadas con la solución salina tanto por 4 h como por 24 h. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($p < 0.05$, test de Bonferroni). **B.** En las plantas bajo los tratamientos salinos el P_o presentó valores positivos y significativamente diferentes a los medidos en las plantas en medio control (sin agregado de sales). Se presenta la media \pm SEM de un total de $n = 3$ experimentos independientes, las letras indican diferencias significativas. L_{pr} : conductividad hidráulica de la raíz; P_o : abscisa al origen; en las referencias se indican si el tratamiento se realizó con NaCl o con KCl, y el tiempo durante el que se aplicó el tratamiento.

b. Determinación de P_o

La determinación de L_{pr} involucró la confección un gráfico por cada raíz analizada donde se relacionaron el flujo producido con las presiones aplicadas sobre la raíz. Cada curva de flujo (J_v) en función de la presión (P) obtenida durante las mediciones en la cámara de Scholander fue extrapolada para determinar la presión correspondiente a un $J_v = 0 \mu\text{L s}^{-1}$ (abscisa al origen). Este parámetro se denomina en la literatura P_o (Boursiac *et al.*, 2005) y es un estimador de la presencia de un gradiente osmótico interno dentro del órgano que debe contrarrestarse al aplicar la sobrepresión (P) con la cámara de Scholander. En la **Figura 9 B** se representó el resultado obtenido del total de plantas medidas. Las plantas en condiciones control (SH) presentaron un P_o (-0.026 ± 0.013) MPa no distinto de cero (test de Student, $p < 0.05$). En cambio, en las plantas sujetas a los tratamientos salinos el P_o resultó positivo lo que sugeriría que existe un gradiente de potencial osmótico negativo entre la vasculatura y el medio en que se encuentran las raíces. El incremento en la salinidad de la SH promovió la generación de este umbral osmótico en las raíces de *Beta vulgaris*. Se observó una tendencia a la disminución de los valores de P_o en las plantas después de 24 h de tratamiento, aunque no son resultados significativamente diferentes a los determinados en las plantas sometidas al tratamiento por 4 h.

c. Determinación de la capacidad de transporte en la misma planta en la cámara de Scholander bajo un gradiente osmótico desfavorable y favorable.

Dadas las características del método y el resultado de P_o obtenido, la reducción observada puede corresponder al ingreso forzado de las sales durante la presurización dentro de la cámara de Scholander. Por ello se procedió a determinar en las mismas raíces L_{pr} en un medio sin sales agregadas. Las raíces de plantas sujetas al tratamiento fueron montadas dentro de la cámara de Scholander y se procedió a medir el flujo (J_v) en función del tiempo. Las raíces se encontraban en la SH suplementada y posteriormente se introdujo *la misma raíz* en una SH sin suplementar⁹. La L_{pr} no fue significativamente diferente entre la primera etapa de medida –raíces en la solución SH+ sales- y la segunda etapa –raíces en SH-, como puede observarse en la **Figura 10**. Al realizar el cambio de medio se produjo un

⁹ La presurización de las raíces promueve el ingreso de solución al interior de la raíz. De acuerdo al diseño experimental, en la etapa donde las raíces se incubaron en el medio con tratamiento salino se favorece el ingreso de agua y sales. Luego, al transferir la misma raíz al medio sin sales agregadas se espera un flujo de agua generado tanto por la presurización como por la presencia de sales acumuladas en el interior de la raíz. Durante el cambio de medio, se observó un incremento marcado del flujo a presión constante que se atribuyó al efecto de las sales presentes en la vasculatura. Por ello, la determinación de L_{pr} fue realizada cuando se encuentra estable el flujo a presión constante.

incremento (salto) del flujo a través de la raíz, seguido de una estabilización hasta valores semejantes a los del inicio. El salto observado se atribuyó al flujo de agua cuya fuerza impulsora es consecuencia de la presurización en la cámara de Scholander que fuerza también el ingreso hacia el interior de la raíz de la sal presente en el medio. En plantas control este salto no se observó. En ambos tratamientos, el sistema recupera espontáneamente las condiciones iniciales de flujo. Por lo tanto, se pudo comprobar que la capacidad de transporte de la raíz en ambas condiciones fue equivalente. Estos resultados verificaron que la metodología propicia el ingreso de sales al interior de la vasculatura. Por ello en las determinaciones subsiguientes, se procedió a realizar las mediciones de L_{pr} en un medio SH sin suplementar para evitar de esta manera un posible efecto nocivo producido por el ingreso masivo de sal al interior de la raíz dada la presurización realizada en la cámara de Scholander.

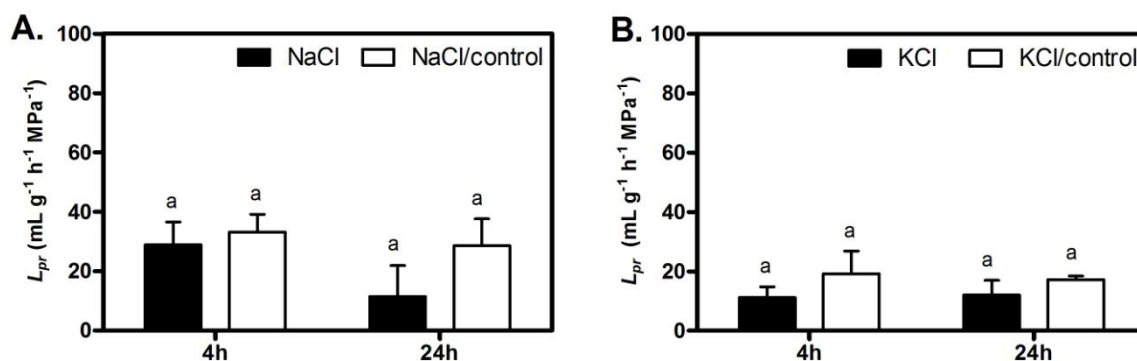


Figura 10: Caracterización de las propiedades hidráulicas de las raíces afectadas previamente por el tratamiento salino. Se procedió a medir la L_{pr} en las raíces de plantas que habían estado sometidas al tratamiento salino. Las plantas se dispusieron dentro de un tubo Falcon con la solución en que se encontraban, SH + NaCl o SH + KCl (barras negras); y se procedió a realizar la determinación de L_{pr} en la cámara de Scholander. Posteriormente se despresurizó la cámara y se procedió a colocar la misma raíz dentro de la cámara ahora en una solución SH sin suplementar (barras blancas, control). **A.** Determinaciones realizadas en plantas que habían estado bajo el tratamiento con NaCl 200 mM por 4 h y 24 h. **B.** Determinaciones realizadas en plantas que habían estado bajo el tratamiento con KCl 200 mM por 4 h y 24 h. Se presentan la media \pm SEM de un total de n:3 experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre las dos condiciones probadas (Bonferroni test, $p < 0.05$).

En conclusión, ante la modificación del potencial hídrico de la SH, las raíces de *Beta vulgaris* presentaron una fuerte reducción de la capacidad para transportar agua desde el medio hacia la vasculatura. La disminución de la capacidad de transporte resultó asociada a un cambio en el gradiente de potencial osmótico entre el medio y la vasculatura (P_o). Los dos fenotipos diferentes presentaron semejantes propiedades hidráulicas en la raíz en cuanto a la absorción de agua y en la hoja respecto a la pérdida de agua.

3. Caracterización del ajuste radial: modulación de la vía celular y el apoplasto

Ante la equivalente capacidad de transporte determinada en las raíces y los diferentes fenotipos observados, se procedió a determinar cómo se modificaban los elementos involucrados en las vías del pasaje de agua a través de la raíz en las plantas tratadas con NaCl o KCl por 4 h y 24 h.

3.1. Modulación del apoplasto

La deposición de suberina en la exodermis y endodermis de las plantas es un mecanismo que permite modificar el camino por el que se mueve el agua en la raíz. La hidrofobicidad de las láminas de suberina afectan profundamente el pasaje de agua entre los espacios celulares modificando la vía apoplástica (Enstone *et al.*, 2002). Por lo tanto, es uno de los mecanismos irreversibles ligado a la tolerancia a largo plazo reportado en múltiples especies de plantas. La tinción con Sudan red IV ha sido utilizada para estudiar y caracterizar la anatomía de las raíces y poder discriminar las vías involucradas en el pasaje de agua (Enstone, 1977, Martre *et al.*, 2001; Vandeleur *et al.*, 2009; Sutka *et al.* 2011). A partir de cortes en fresco de las raíces de *Beta vulgaris* se determinó cualitativamente el patrón de suberización. Este procedimiento, para obtener cortes de tejido, presenta como ventaja que se puede analizar *in situ* cada tratamiento, pero presenta como inconveniente que no es posible estandarizarlo en cuanto al espesor. Por lo tanto, la técnica brinda información cualitativa y no es factible realizar una caracterización semi- cuantitativa de la deposición de suberina.

Las raíces de las plantas control en la región analizada no presentaron una suberización significativa de la endodermis y/o de la exodermis (**Figura 11 A y D**). Dada la importancia que tiene la deposición de suberina en el desarrollo y maduración de los tejidos se procuró comparar cortes de la misma edad y en el mismo estadio de desarrollo (Sharp *et al.*, 2004). Por ello en la **Figura 11, A** se muestra un corte control representativo y con el que se compararon los tratamientos de 4 h; mientras, la **Figura 11 D** muestra un corte representativo del control con los que se compararon los tratamientos de 24 h.

Después de 4 h de tratamiento en las fotografías de las raíces en el medio salino no presentaron diferencias respecto de los controles, acorde con los reportes de la bibliografía que proponen a los cambios en la suberización como mecanismos a largo plazo e irreversibles involucrados en la tolerancia (Taleisnik *et al.*, 1999; Munns & Tester, 2008; Horie *et al.*, 2012). En cambio, aquellas plantas que se encontraron por 24 h bajo el tratamiento salino presentaron un incremento en la suberización de la

endodermis que se evidenció en el incremento en la tinción (**Figura 11 E y F**). Después de 24 h de tratamiento, ambos tratamientos salinos promovieron un incremento en la deposición de suberina en la endodermis aunque no en la exodermis. La reducción en la capacidad de transporte observada en estas plantas podría estar asociada a la modificación de la vía apoplástica.

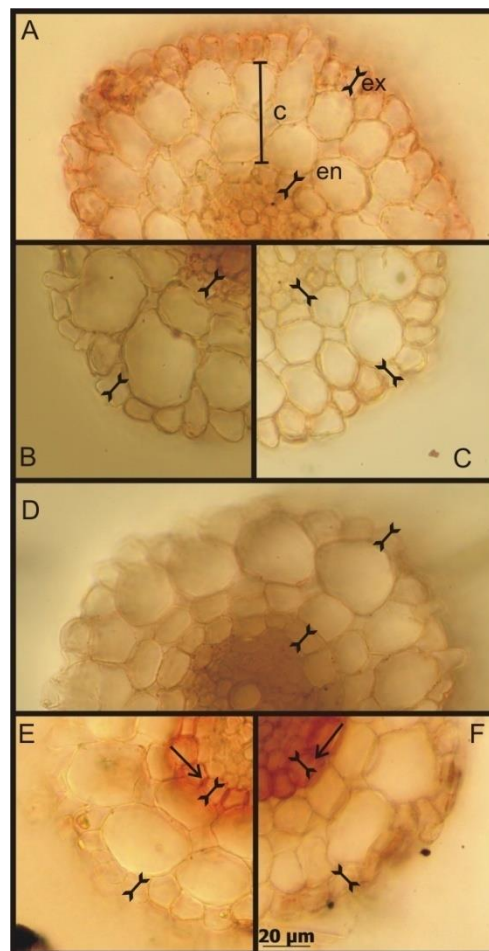


Figura 11: Determinación cualitativa de la deposición de suberina en las raíces de *Beta vulgaris*. Los cortes transversales en fresco de las raíces de *Beta vulgaris* fueron coloreados con Sudan IV para determinar la deposición de suberina en torno a la pared celular. Los cortes presentados corresponden a plantas en: **A.** medio control (SH) después de 4 h de iniciados los tratamientos. **B.** medio suplementado con NaCl (SH+ NaCl) después de 4 h de iniciados los tratamientos. **C.** medio suplementado con KCl (SH+ KCl) después de 4 h de iniciados los tratamientos. **D.** medio control (SH) después de 24 h de iniciados los tratamientos. **E.** medio suplementado con NaCl (SH+ NaCl) después de 24 h de iniciados los tratamientos. **F.** medio suplementado con KCl (SH+ KCl) después de 24 h de iniciados los tratamientos. En las seis condiciones presentadas, la **Figura** muestra un corte a modo de ejemplo de los n=10 experimentos independientes donde se observó el mismo patrón. **ex:** exodermis; **en:** endodermis; **c:** corteza. En la imagen **F** se presenta la escala que es común a todas las fotografías puesto que fueron capturadas con el mismo aumento. Las flechas señalan la deposición de suberina denotada por la coloración con Sudan IV. Los segmentos con doble punta indican la línea celular asociada a la endodermis y a la exodermis.

3.2. Modulación de la vía celular

La participación de la vía celular en la modulación del flujo de agua en la raíz se atribuye principalmente a la participación de las acuaporinas de membrana plasmática, dado que son transportadores de agua con capacidad de modificar la permeabilidad al agua de la membrana donde se expresan. En *Beta vulgaris* se analizó el flujo a través de la raíz en la cámara de Scholander obtenidas de plantas previamente tratadas con un agente inhibidor de la vía celular. Se probaron dos inhibidores cuyos mecanismos de acción propuestos son diferentes: el HgCl_2 y el ácido propiónico.

A diferencia de otros reportes en la literatura, después de 20 minutos de tratamiento con HgCl_2 (50 μM) en las raíces de *Beta vulgaris* no se observaron modificaciones en el flujo de agua. Particularmente, 20 minutos es el tiempo de incubación más extenso de los probados en la literatura para este agente. Se procedió a caracterizar el estado de las plantas tratadas con este inhibidor para verificar si el mercurio ingresaba en las plantas. En las plantas tratadas por 20 minutos se midió la tasa transpiratoria de acuerdo con el método descrito por Verslues (2006). Si bien las raíces no mostraron una reducción significativa del flujo de agua, en las hojas la tasa transpiratoria se redujo significativamente en las plantas que se encontraron bajo la acción del inhibidor. Asimismo, se realizaron una serie de experimentos donde se mantuvieron a las plantas bajo tratamiento por al menos 1 h. Dentro de los primeros 45 minutos, aquellas plantas que se encontraron en la SH suplementada con HgCl_2 presentaron un decrecimiento de la turgencia, el que se revirtió después de 24 h en SH suplementada con ditioneitol (DTT, 5 mM). En conjunto estos resultados sugieren que el flujo de agua en las raíces de *Beta vulgaris* en las condiciones de crecimiento estudiadas no es susceptible a la inhibición por mercurio. La tasa transpiratoria en cambio fue significativamente afectada en presencia de este inhibidor como ha sido reportado para Sorgo (Choudhary *et al.*, 2013). En el laboratorio donde se ha desarrollado estos experimentos de la tesis de doctorado, aplicando el mismo protocolo, la raíz de *Sorghum bicolor* (var. 9530) en presencia de HgCl_2 presenta una significativa inhibición de la conductividad hidráulica (Sutka *et al.*, 2016).

El flujo de agua a través de las raíces de remolacha no fue susceptible tampoco al efecto de la acidificación mediada por ácido propiónico. En las plantas control la vía celular no resultó susceptible a los agentes mercuriales y/o a la acidificación por lo que en la vía celular las acuaporinas sensibles a mercurio o a acidificación no contribuirían significativamente a la modulación del flujo de agua. Dentro del laboratorio se ha procedido con el mismo protocolo y se ha corroborado inhibición de 60% de la conductividad hidráulica en presencia de HgCl_2 en otras especies

vegetales (Zhang & Tyerman, 1999; Martínez-ballesta *et al.*, 2003; Moira Sutka *et al.*, 2011; Sutka *et al.*, 2016).

En las plantas bajo el tratamiento salino los flujos determinados fueron pequeños respecto a los medidos en las plantas control. La falta de efecto del tratamiento con el inhibidor también se observó en este caso. En este caso, se puede suponer que el efecto del ruido de la técnica afecta mucho más la determinación puesto que los niveles de flujo determinados fueron al menos cuatro veces inferiores a los determinados en las plantas control. Por lo tanto, la inhibición mediada por el agente podría encontrarse apantallada por el ruido.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el cambio en el fenotipo no se reflejó en las determinaciones de las propiedades hidráulicas ni se evidenciaron estrategias diferentes entre los tratamientos utilizados con cada uno de los cationes. Frente a la reducción del potencial hídrico del suelo solamente el cambio en el potencial osmótico resultó significativamente diferente como los cambios en la turgencia del fenotipo. A partir de esto podemos considerar que la fase del tratamiento sería puramente osmótica (Munns & Tester, 2008). Por lo tanto, se procedió a analizar las propiedades hidráulicas en las plantas cuando el tratamiento se suspendió. En otras palabras, se caracterizaron las propiedades hidráulicas de plantas cuando la señal de potencial hídrico se restaura a la condición inicial, para evaluar la dinámica hidráulica.

4. Caracterización de las propiedades hidráulicas en las plantas después de la suspensión del tratamiento: la recuperación

En contraste a nuestro supuesto inicial, los dos fenotipos observados no difirieron en sus propiedades hidráulicas ni fueron diferentes las respuestas ante los dos tratamientos salinos aplicados. Los cambios de suberización observados fueron rápidos en relación a los reportes en otras especies donde las modificaciones irreversibles se reportan dentro de las semanas del tratamiento (Taleisnik *et al.*, 1999; Munns & Tester, 2008; Horie *et al.*, 2012). Se procedió a determinar la capacidad de respuesta del sistema hidráulico ante la suspensión del estrés (**Figura 3**).

4.1. La recuperación de g_s después de la suspensión de los tratamientos¹⁰

En las plantas que habían sido tratadas durante 4 h con NaCl, g_s se incrementó significativamente al restaurar las plantas a la solución control (SH) dentro de la

¹⁰ Para comparar las determinaciones de la conductancia estomática con las determinaciones realizadas en las raíces de *Beta vulgaris*, solo se presentaron las determinaciones realizadas después de 1 h y 24 h de suspendido el tratamiento salino. Ver siguiente nota al pie.

primera hora de suspensión del tratamiento (**Figura 12 A**, Tiempo en SH: 1h). El mismo perfil de recuperación se observó en las plantas que habían sido tratadas con KCl por 4 h (**Figura 12 A**, barras grises). Por lo tanto, el perfil de recuperación de la conductancia estomática no resultó sensible a los agentes catiónicos aplicados en los tratamientos (Anova de dos factores, $F_{(1,22)} = 3.06$; $p: 0.0940$). En las plantas que habían sido tratadas por 24 h con NaCl el perfil de recuperación de g_s resultó diferente al de las plantas que habían sido tratadas con KCl (**Figura 12 B**). Después de la primera hora de permanencia en la solución Hoagland (tiempo en SH: 1 h), la g_s en las plantas previamente tratadas con NaCl por 24 h fue significativamente mayor al de las plantas previamente tratadas con KCl por 24h. En ambos casos se observó que después de 24h de SH, los valores de g_s no difirieron entre los iones. Cuando las plantas habían sido tratadas por 24 h, el perfil de recuperación de g_s resultó dependiente del catión involucrado en el tratamiento (Anova de dos factores, $F_{(1,16)}: 12.99$, $p: 0.0024$).

La recuperación de g_s en las plantas que sólo habían sido tratadas por 4 h fue independiente de los cationes involucrados, y sensible solamente a las modificaciones del potencial hídrico del suelo. En cambio, se evidenció que después de 24 h de tratamiento las diferencias observadas entre los perfiles de recuperación en la **Figura 12 A** y **B** evidenciaron que existirían estrategias diferentes en la parte aérea.

4.2. La recuperación de L_{pr} después de la suspensión de los tratamientos¹¹

La recuperación de las propiedades hidráulicas de la raíz después de 4 h de tratamiento presentó una dependencia con el catión involucrado en el tratamiento (**Figura 12 C**). En las plantas que habían sido tratadas con KCl por 4 h (barras grises) se observó un incremento significativo de L_{pr} al retornar las plantas a SH por al menos 1 h. Los valores de L_{pr} medidos en las plantas tratadas con KCl se mantuvieron constantes incluso después de 24 h de restaurado a SH. En cambio, las plantas que habían sido tratadas por 4 h con NaCl no presentaron diferencias en este parámetro después de 1 h de suspendido el tratamiento. Por ello, en este tratamiento la primera fase (Tiempo en SH: 1h) de recuperación fue más lenta que las plantas tratadas con KCl. En contraste, después de 24 h de tratamiento las plantas que habían sido

¹¹ La determinación de L_{pr} se realizó en las plantas después de 0.5 h, 1 h, 4 h y 24 h de suspendido el tratamiento. No se observaron diferencias entre la respuesta medida después de 0.5 h, 1 h y 4 h. Por lo tanto se presentaron en los resultados de esta Tesis sólo las determinaciones realizadas después de 1 h ó de 24 h de suspendido el tratamiento.

tratadas por 4 h con NaCl presentaron una L_{pr} significativamente mayor a la medida en las plantas que habían sido tratadas con KCl por 4 h (**Figura 12 C**).

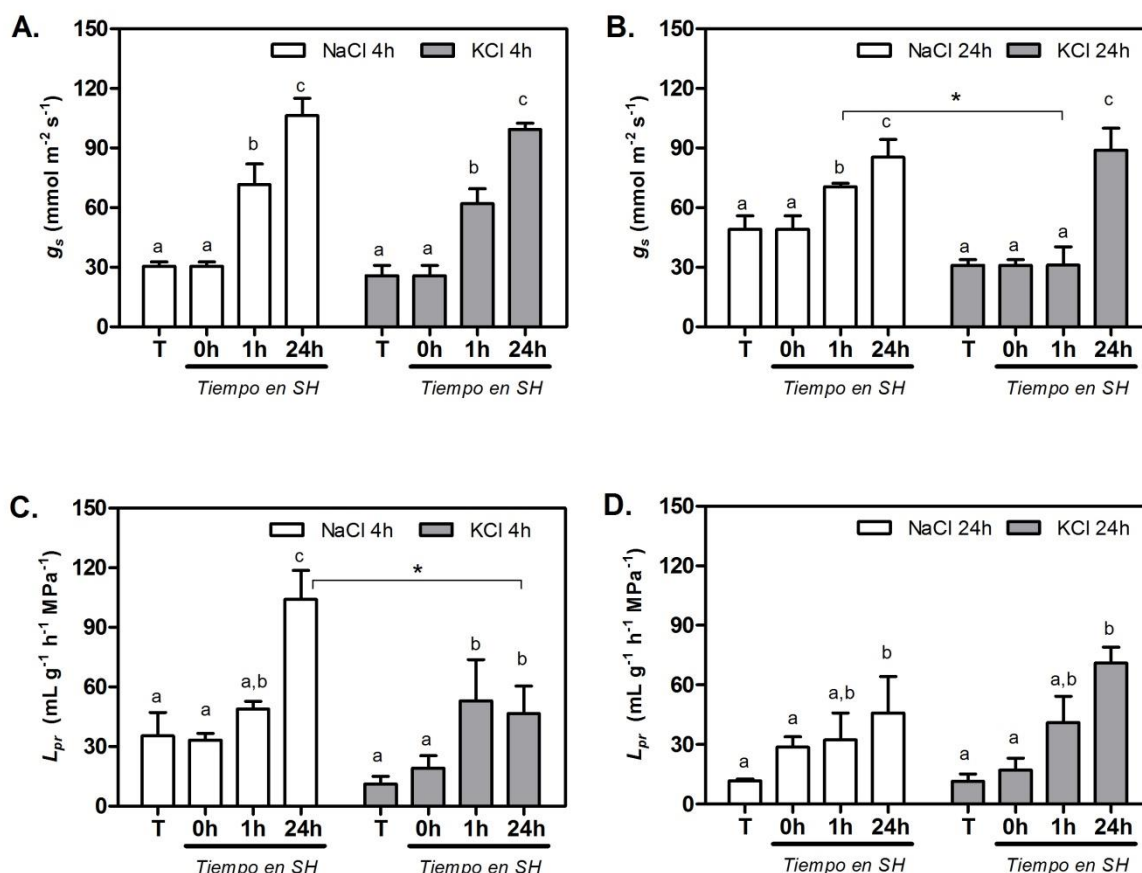


Figura 12: Caracterización de las propiedades hidráulicas de *Beta vulgaris* ante la suspensión del tratamiento. Después del tratamiento (T), las macetas en que se encontraban las plantas fueron vaciadas y se añadió solución Hoagland (SH) sin sales agregadas. Se registraron las propiedades hidráulicas de las plantas durante el tiempo que estuvieron en la SH para determinar cómo se produjo la recuperación del sistema. **A y B.** Perfil de recuperación de la g_s (conductancia estomática) en plantas tratadas con NaCl (barras blancas) o con KCl (barras grises) durante 4 h o 24 h. **C y D.** Perfil de recuperación de la L_{pr} (conductividad hidráulica) en plantas tratadas con NaCl o con KCl. Los resultados corresponden a la media \pm SEM de un total de tres experimentos independientes en cada condición. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las barras del mismo tratamiento ($p < 0.05$, test de Bonferroni). El asterisco indica diferencias significativas entre las barras de distintos tratamientos ($p < 0.001$, test de Bonferroni). T: condición cuando la planta se encuentra bajo el tratamiento; Tiempo en SH: tiempo transcurrido desde la restauración al medio control (0h; 1h; 24h).

Cuando se evaluó la recuperación de las propiedades hidráulicas de la raíz en las plantas que habían permanecido en el tratamiento salino por 24 h, la recuperación de L_{pr} resultó similar en las plantas tratadas con NaCl respecto a las tratadas con KCl. El perfil de recuperación no presentó diferencias que puedan atribuirse al catión involucrado en el tratamiento previo (Anova de dos factores, $F_{(1,16)} = 0.58$, $p = 0.4588$) (**Figura 12 D**).

La recuperación de L_{pr} en plantas tratadas con KCl fue independiente del tiempo durante el que se aplicó el tratamiento. Al comparar las plantas tratadas con KCl por 4 h y 24 h, en la **Figura 12** se observa que después de 1 h en la nueva solución Hoagland (sin sales) las plantas presentaron un L_{pr} significativamente mayor al determinado en presencia de KCl. Por lo que el perfil de recuperación de L_{pr} fue independiente del tiempo de tratamiento. En otros términos, el efecto de K^+ sería independiente del tiempo durante el que se aplicó el tratamiento en la planta.

Ante la suspensión de tratamiento salino, las propiedades hidráulicas de las plantas de *Beta vulgaris* presentaron características diferentes ante los tratamientos iónicos realizados. Mientras bajo el tratamiento salino (tanto NaCl como con KCl) donde L_{pr} y g_s se redujeron en igual proporción entre sí en los dos tiempos analizados (4 h y 24 h); al suspender el tratamiento la recuperación de L_{pr} ante el mismo tratamiento presentó una estrategia diferente a la determinada en g_s . Los patrones de recuperación de ambos parámetros hidráulicos (g_s y L_{pr}) resultaron desacoplados.

Discusión

1. En las primeras 24 h de tratamiento las plantas de *Beta vulgaris* alcanzan un nuevo estado estacionario luego de incrementar la salinidad del suelo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, *Beta vulgaris* desencadena una estrategia tolerante para alcanzar un nuevo estado estacionario mediante la reducción de TCR, CA y E (**Figura 4**, **Figura 5**, **Figura 7**). Los tratamientos determinaron una reducción del CA en las plantas del 2 % respecto a los niveles presentados en las plantas control (93.6 ± 0.5 %). Este parámetro no presentó una correlación con el fenotipo turgente, puesto que después de 24 h de tratamiento la recuperación del aspecto turgente ocurrió sin aumento de CA. En presencia del tratamiento salino en todas las plantas se observó un CA de 92.4 % (± 0.4). La disminución de la turgencia observada (4 h de tratamiento) no podría ser atribuida a una modificación del contenido de agua. El principal parámetro hídrico ligado a esta estrategia resultó ser el ajuste del potencial osmótico (**Figura 5** y **Tabla 1**). La eficiencia de este modelo vegetal para lidiar con el tratamiento aplicado fue compatible con las estrategias reportadas para otros miembros de la subfamilia de las Chenopoiaceae (Lindhauer *et al.*, 1990; Ghoulam *et al.*, 2002; Pakniyat & Armion, 2007; Abbas *et al.*, 2012).

1.1. El cambio en el fenotipo está asociado al ajuste osmótico en la hoja

Bajo el tratamiento salino, el ajuste del potencial osmótico registrado en *Beta vulgaris* es atribuible a los osmoprotectores que han sido reportados en esta subfamilia. Los principales osmolitos que se describen involucrados en la osmoregulación son la prolina, glicinbetaína, así como el sodio (Draycott 2006¹²). Si bien la estrategia de síntesis de osmoprotectores ha sido propuesta en diferentes especies vegetales (Flowers & Colmer, 2008), los tiempos de tratamiento aplicados fueron cortos por lo que debería evaluarse si el ajuste osmótico fue a causa de la síntesis de nuevos osmolitos, su recirculación o liberación desde la vacuola.

1.2. La redistribución de los cationes Na^+ y K^+ no fue equivalente durante los tratamientos aplicados

La redistribución iónica y la homeostasis del agua están íntimamente relacionadas en la tolerancia ante el incremento de salinidad en los suelos (Tester & Davenport, 2003; Shabala & Cuin, 2008; Shabala, 2013). En las plantas de remolacha, tanto la raíz como la hoja mostraron un incremento en la relación Na^+ / K^+ cuando las plantas habían estado en el medio suplementado con NaCl. Dado que los niveles de K^+ no mostraron diferencias entre las plantas Control (**Figura 38**, Anexo) y bajo los tratamientos salinos, se atribuyó la modificación de la relación entre estos cationes al incremento en la concentración de Na^+ . La variación de este coeficiente sugiere que uno de los osmolitos involucrados en el ajuste osmótico de las hojas sería el Na^+ , al ingresar dentro de las plantas. De esta forma se evidenció la importancia de la identidad del catión en la estrategia tolerante desencadenada en remolacha.

En remolacha y arroz, se ha demostrado que el Na^+ tiene la capacidad de reemplazar al K^+ dentro de la planta en forma imperfecta cuando el medio presenta niveles deficientes de K^+ (Subbarao *et al.*, 1999; Horie *et al.*, 2007; Wakeel *et al.*, 2010; Pi *et al.*, 2014). En plantas de remolacha azucarera se ha demostrado que el Na^+ reemplaza cuantitativamente los niveles de K^+ cuando este se encuentra en deficiencia, especialmente en la parte aérea. Si bien esta sustitución equipararía el rol osmótico que el K^+ desempeña, las plantas presentan modificaciones en parámetros esenciales del crecimiento como el desarrollo de biomasa y de allí la utilización del término imperfecto para describir el evento (Pi *et al.*, 2014). En esta tesis los efectos asociados a la sustitución del K^+ por el Na^+ pueden descartarse puesto que la solución Hoagland siempre presentó la misma concentración de K^+ en

¹² En esta publicación se puede consultar un análisis de los reportes disponibles sobre remolacha azucarera en diferentes aspectos del cultivo, entre ellos la osmoregulación.

las plantas control como en las sometidas a los tratamientos. Por lo tanto, la recirculación del Na^+ descrita evidenció el mecanismo presente en la planta para poder distribuir este osmolito cuando se encuentra en exceso, como ha sido anteriormente reportado (Poole, 1971; Abbas *et al.*, 2012).

1.3. El nuevo estado estacionario se caracteriza por un menor gradiente de potencial hídrico a lo largo de la planta

Las diferencias observadas en el potencial osmótico entre las 4 h y las 24 h desde el inicio del tratamiento sugieren que la recuperación de la turgencia está mediada por un cambio en el gradiente de potencial hídrico a lo largo de la planta. El nuevo estado estacionario (después de 24 h de tratamiento) se caracteriza por tener un potencial osmótico equivalente al potencial hídrico de la solución Hoagland suplementada con sales (≈ -0.9 MPa, Vitali *et al.*, 2015). En este aspecto es relevante cuestionarse cómo se produce la redistribución dentro de las células y el mesófilo para sostener el ingreso de agua en forma pasiva, ante la ausencia de un gradiente favorable. Si bien en las primeras horas del tratamiento podría suponerse que la pérdida de turgencia observada fue consecuencia de la salida de agua desde la planta hacia el medio circundante. Entonces, se hubiera esperado la restauración del CA después de 24 h de tratamiento. Sin embargo, se observó que el CA se redujo respecto de las plantas control ante la aplicación del tratamiento y no se restauró cuando el gradiente de potencial hídrico fue favorable (después de 24 h de tratamiento). Por ello este diseño experimental resulta interesante para evaluar la estrategia de la planta ante la condición de estrés, y por ello constituye el diseño experimental elegido.

2. Las propiedades hidráulicas se encuentran marcadamente reducidas en el nuevo estado estacionario desencadenado ante el tratamiento salino en *Beta vulgaris*.

La conductancia estomática (g_s) y la conductividad hidráulica (L_{pr}) presentaron una reducción del $\approx 80\%$ ante el tratamiento aplicado respecto de las plantas control (en medio Hoagland sin suplementar, SH).

2.1 Los tratamientos salinos aplicados determinaron el mismo efecto sobre la conductancia estomática y la conductividad hidráulica de la raíz

La similitud entre las respuestas en las plantas tratadas con NaCl o KCl ha sido también reportada en otras especies vegetales al caracterizar la modulación de la conductancia estomática (g_s) en la parte aérea. En trigo se ha caracterizado a la conductancia estomática como un buen indicador del estrés osmótico entre

diferentes genotipos, y ha sido reportado que este parámetro es independiente del catión involucrado en el tratamiento ya sea este NaCl o KCl (Rahnama *et al.*, 2010). Ante la reducción del potencial hídrico del medio externo, los parámetros hidráulicos reflejaron una estrategia centrada en evitar la pérdida de agua. En conjunto, las dos principales vías involucradas en el ingreso y salida del agua se redujeron. En cuanto a la parte aérea este tipo de respuesta suele interpretarse como una estrategia para evitar la pérdida de agua. En cuanto a la contribución de la raíz, la reducción de L_{pr} dificulta tanto la entrada de agua como la salida de agua por la menor capacidad determinada experimentalmente en la raíz. En este aspecto, es necesario en este aspecto evaluar si la bi-direccionalidad de la conducción del órgano es fisiológicamente viable. En principio, a partir de los reportes de la literatura es posible comparar los resultados obtenidos en raíces mediante diferentes metodologías. Cuando se utilizan diferentes aproximaciones experimentales como High Pressure Flow Meter (HPFM) y la cámara de Scholander, donde la dirección del flujo es opuesta, la capacidad de conducción en ambos sentidos es diferente. Por lo tanto, no se puede suponer que la reducción en la L_{pr} de las raíces repercuta en forma equivalente en la entrada de agua a la planta como en la salida de agua hacia el medio circundante.

Las evidencias recolectadas de la literatura no siempre confirman una correlación directa entre la modificación en la tasa transpiratoria y la conductividad hidráulica de la raíz. En trigo se ha observado una fuerte correlación entre el incremento en la conductividad hidráulica de la raíz y la tasa transpiratoria (Wang *et al.*, 2013), en conjunto con un incremento en la expresión de acuaporinas como las TaPIP1;2 y TaPIP2;5 en la raíz. En cambio, en *Lotus japonicus*, los cambios en la transpiración en el vástago no se reflejan en modificaciones de L_{pr} (T. Henzler *et al.*, 1999). Recientemente se ha mostrado que la separación del vástago de la raíz induce modificaciones en la expresión de las acuaporinas expresadas en ciertas regiones esenciales de la raíz (Vandeleur *et al.*, 2014) y que las propiedades hidráulicas guardan una relación con el tiempo post cosecha (Meng *et al.*, 2016). Por lo tanto, metodológicamente la determinación simultánea (in vivo) del conjunto de parámetros que reflejen el estado hídrico es fundamental si queremos comprender su participación en el ajuste hidráulico. En los últimos años la incorporación de las plataformas de fenotipado han contribuido a la caracterización y profundización de los sistemas integrales particularmente enfocados en las cualidades de la parte aérea (Caldeira *et al.*, 2014).

3. Las propiedades hidráulicas fueron equivalentes entre sí para el fenotipo de 4 h y 24 h de tratamiento

La transición entre los fenotipos *poco turgente* (4 h) y de *recuperación de la turgencia* (24 h) no se reflejó en las propiedades hidráulicas. Por lo tanto, si bien se determinó un cambio en el potencial osmótico, el rol de la modulación del potencial osmótico en la hoja formaría parte de la vía de señalización iniciada en la raíz cuando se añadió sales al medio SH. En conjunto, esta estrategia es compatible al mecanismo propuesto en la literatura para el ABA (ácido absísico) donde, ante la reducción del potencial hídrico del suelo, se desencadena la señal que promueve su translocación y re síntesis, modulando especialmente la apertura estomática (Finkelstein, 2013; Pantin *et al.*, 2013).

En las raíces de *Beta vulgaris* la reducción de la conductividad hidráulica observada ante el incremento de la salinidad del medio fue compatible con reportes en otras especies vegetales (Martínez-Ballesta, *et al.*, 2003; Boursiac *et al.*, 2005; Postaire *et al.*, 2010; Martínez-Ballesta *et al.*, 2011). En comparación con datos de la bibliografía (**Figura 13**), *Beta vulgaris* presenta la máxima inhibición reportada en condiciones análogas de crecimiento utilizando la cámara de Scholander como estrategia experimental de medida. Es posible observar que el tiempo durante el que se aplica el tratamiento no resultaría crucial en la inhibición reportada, sino que la reducción de L_{pr} presenta una fuerte dependencia con la especie vegetal estudiada y la concentración de NaCl añadido al medio. En *Arabidopsis thaliana* como en *Capsicum annuum* de las que se dispone de un mayor número de determinaciones, la inhibición máxima observada no guarda correlación con el tiempo de aplicación del tratamiento. En este contexto, cabe preguntarse si la inhibición máxima es compatible con un estado de mínima conducción del circuito hidráulico en el marco de la Ley de Ohm (tema desarrollado en el Siguiendo Capítulo).

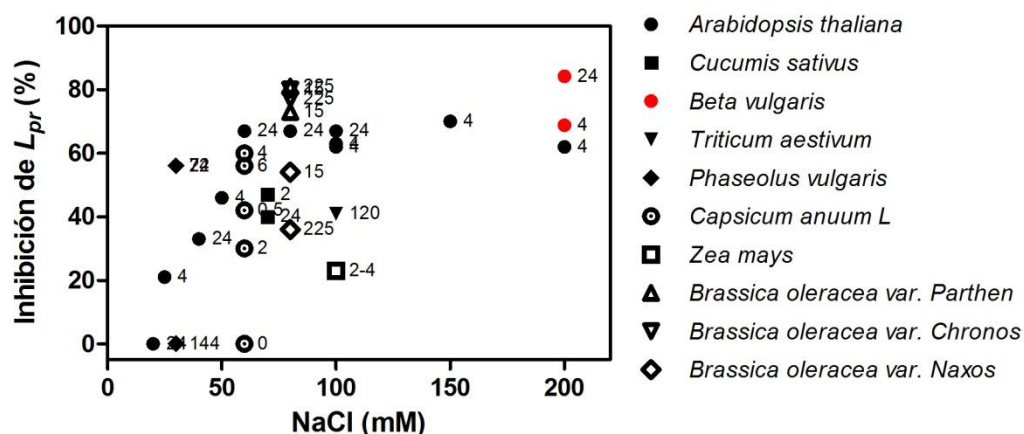


Figura 13: El efecto del tratamiento con NaCl en diferentes concentraciones sobre L_{pr} de distintas especies. Se representa en el gráfico la inhibición porcentual de L_{pr} respecto a los niveles de plantas sin tratamiento reportado para diferentes especies vegetales en la literatura en comparación con los resultados obtenidos para *Beta vulgaris* (círculos colorados) en este capítulo. Todos los reportes corresponden a determinaciones realizadas en la cámara de Scholander. Los números asociados a cada símbolo corresponden al tiempo durante el que se aplicó el tratamiento con NaCl medido en horas. A partir de estos resultados es posible observar que la reducción de L_{pr} no está ligado al tiempo durante el que se aplicó el tratamiento. Asimismo, es interesante destacar que la inhibición aquí reportada para remolacha es comparable a la máxima inhibición reportada en este tipo de tratamiento. Fuentes: (Azaizeh *et al.*, 1991; Martínez-Ballesta *et al.*, 2003; Boursiac *et al.*, 2005; Mu *et al.*, 2006; Ehlert *et al.*, 2009; Sutka *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Muries *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2014; Calvo-Polanco *et al.*, 2014; Fricke *et al.*, 2014; Laur & Hacke, 2014; Vitali *et al.*, 2015).

4. La reducción en la capacidad de conducción de la raíz (L_{pr}) fue independiente de la modificación del patrón de suberización

La diferencia observada en la deposición del patrón de suberina en la endodermis distingue entre los fenotipos asociados a las fases del tratamiento.

4.1 El incremento de la suberización favorece el pasaje a través de la vía celular en la raíz

Después de 24 h de tratamiento, el ajuste osmótico descrito y la recuperación de la turgencia presentó una modificación en el patrón de deposición de suberina en la endodermis. Esta modificación de la vía apoplástica afecta la facilidad con la que el agua puede moverse entre las células de la endodermis. En consecuencia, el flujo se ve *forzado* a moverse a través de la vía celular, tradicionalmente propuesta como más resistiva. Se ha demostrado que en plantas de trigo el apoplasto contribuye a aumentar la absorción de agua en la vía radial de la raíz durante el desarrollo. Sin embargo, cuando estas plantas de trigo (*Triticum aestivum*) se encuentran bajo un tratamiento con NaCl, la vía celular se vuelve crucial para la absorción de agua (Fricke *et al.*, 2013). De acuerdo con la clasificación de la FAO, en tanto *Beta vulgaris*

es una especie tolerante a la salinidad mientras que el trigo es una especie moderadamente tolerante. Por lo tanto, en las especies halo-tolerantes es posible que la participación de la vía celular desempeñe un papel preponderante como estrategia frente a los elevados niveles de salinidad del medio. En otros términos, estos resultados sugieren que ante la condición adversa es crucial la participación de la vía celular, incluso cuando este camino puede ser más costoso.

La recuperación de las propiedades hidráulicas después de los tratamientos sugiere diferentes estrategias para el movimiento del agua en cada uno de los tratamientos salinos aplicados

La caracterización de L_{pr} y g_s en la recuperación permiten corroborar que los mecanismos subyacentes en cada caso podrían ser diferentes para cada catión y para los dos fenotipos observados. La capacidad de conducción en la raíz es la que discriminó entre los tratamientos aplicados. El perfil de recuperación de la L_{pr} sugiere que la dependencia con los cationes está mediada por la permeabilidad de las membranas en conjunto con las variaciones en el potencial hídrico del xilema. Después de 4 h de tratamiento salino la recuperación de L_{pr} puso en evidencia los diferentes cationes involucrados en el tratamiento aplicado. Después de 24 h de tratamiento, el perfil de recuperación de L_{pr} no presentó diferencias significativas entre los cationes involucrados en el tratamiento. Esto es compatible con las diferencias observadas en el patrón de suberización como mecanismo de modulación a largo plazo. La deposición de suberina aumentada se reflejó también en las propiedades hidráulicas después de suspendido. En consecuencia, la recuperación de los niveles de L_{pr} fue más lenta después de 24 h que durante el tratamiento corto (4 h).

El Na^+ se ha propuesto en las halófitas como un osmolito energéticamente *económico* aunque desencadene efectos tóxicos en el citosol (Tester & Davenport, 2003; Møller *et al.*, 2009). En este aspecto, la semejanza entre los perfiles de recuperación de la g_s y L_{pr} en los tratamientos con este catión permiten suponer una recirculación del sodio dentro de la planta compatible con las determinaciones de Na y K realizadas. Por lo tanto, la recuperación está directamente asociada al nuevo gradiente de potencial hídrico a lo largo de la planta, los caminos involucrados en el pasaje de agua y la recirculación del catión. Tanto la g_s como L_{pr} se recuperan más lento cuando el agente estresante se mantiene por 24 h. Esta respuesta podría adjudicarse a la participación de la vía celular en el pasaje de agua en la raíz dada la deposición de suberina (proceso irreversible). En cambio, las plantas tratadas con KCl presentaron un perfil de recuperación específico para cada uno de los dos parámetros evaluados. Esta diferencia podría asociarse a la relevancia que tiene el K^+ en la señalización

intracelular (Gajdanowicz *et al.*, 2011), para el equilibrio electroquímico de las membranas y especialmente para la recirculación de nutrientes desde el floema (Peng *et al.*, 2004; Munns & Tester, 2008; Karley & White, 2009; Shabala *et al.*, 2010).

4.2 La vía celular resultó insensible a los inhibidores probados

Después de 4 h de tratamiento ninguna de las raíces mostró diferencias apreciables en tanto suberización entre las plantas en el medio control y las que se encontraban bajo tratamiento salino. Este resultado es compatible con los reportes que proponen a la suberización como parte de la fase irreversible de la tolerancia en los mecanismos a largo plazo.

Si bien es posible que la modificación en la L_{pr} registrada se pueda atribuir a la vía celular, las evidencias aquí indican que no es sensible a acidificación o al cloruro de mercurio. La falta de inhibición por $HgCl_2$, pondría en evidencia que las acuaporinas presentes en las membranas no presentarían grupos cisteína accesibles, en cuyo caso incluso el mercurio podría promover un incremento en la permeabilidad al agua. (Frick *et al.*, 2013). En cambio, la falta de inhibición por acidificación (agregado de ácido propiónico en el medio) podría atribuirse a que no hay PIPs (acuaporinas de membrana muy sensibles a acidificación citosólica) o que la capacidad buffer de esta especie es muy alta y en los experimentos no se detecta el efecto de una verdadera acidificación citosólica. Si bien en *Arabidopsis thaliana* (Ehlert *et al.*, 2009) se demostró que el uso de ácido propiónico induce la acidificación localizada en la raíz, este tratamiento debería explorarse en *Beta vulgaris*, mediante técnicas complementarias como fluorometría o una medición de pH con microelectrodos. Ambos procedimientos en estas raíces resultan dificultosos por su coloración y tamaño respectivamente. También, es posible que las acuaporinas presentes en las raíces no se encuentren localizadas en las membranas involucradas en el pasaje de agua medido, por ello es necesario diseñar nuevos ensayos donde evaluar la presencia de acuaporinas en las membranas y registrar su localización a lo largo del tratamiento para poder evaluar si los mecanismos de *trafficking* podrían ser esenciales en la respuesta caracterizada como se ha mostrado en *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2011; Luu *et al.*, 2011).

5. El rol del interruptor físico: la suberización en la raíz

Bajo las suposiciones del modelo compuesto de Steudle podríamos proponer que la recuperación del fenotipo turgente después de 24 h de tratamiento en las plantas de *Beta vulgaris* ocurre específicamente a expensas de la vía celular (cambios en la permeabilidad de las membranas). La barrera física propuesta por este modelo se

detecta después de 24 h de iniciado el tratamiento, y sería responsable de evitar la salida de agua a través de la raíz como consecuencia del gradiente desfavorable. Asimismo, durante la primera fase del tratamiento existiría una pérdida de contenido de agua en la planta como consecuencia de las vías poco resistivas presentes en la raíz y el gradiente desfavorable de potencial hídrico.

En estas suposiciones no es posible interpretar qué papel desempeña la vía celular durante las primeras 4 h de tratamiento. Dado que se trata de la fase osmótica de la respuesta cabe preguntarse, ¿la disminución de turgencia observada es consecuencia de las relaciones determinísticas entre el flujo y el gradiente de potencial hídrico? ¿La capacidad de transporte de la vía celular presente en las plantas de *Beta vulgaris* es suficiente para sostener la demanda de la parte aérea? ¿Cómo se relacionan la vía celular de la raíz y el ajuste osmótico que se desarrolla en las hojas? ¿Es posible hablar también a corto plazo de un interruptor (switch) no físico que sea el disparador de la recuperación de la turgencia? Esta etapa de la respuesta fue abordada a lo largo del siguiente capítulo para poder aclarar cómo la raíz contribuye a la respuesta de *Beta vulgaris*.

Los resultados sugieren nuevos interrogantes, ¿qué papel desempeña el período nocturno en la transición de fenotipo observada? El período de oscuridad asociado podría desempeñar un rol importante en los cambios observados en el fenotipo. Recientemente se ha demostrado a través de una aproximación de modelado que la contribución del influjo de agua desde la raíz durante la noche contribuiría a mantener un mejor estado en la hoja durante los períodos de sequía (Huang *et al.*, 2017). En este caso, puesto que durante la noche la tensión asociada a la demanda transpiratoria se ve anulada y el movimiento de agua está ligado directamente a la recirculación del floema y otros solutos, la posible contribución de este período resaltaría la participación de la vía celular como modulador de la respuesta.

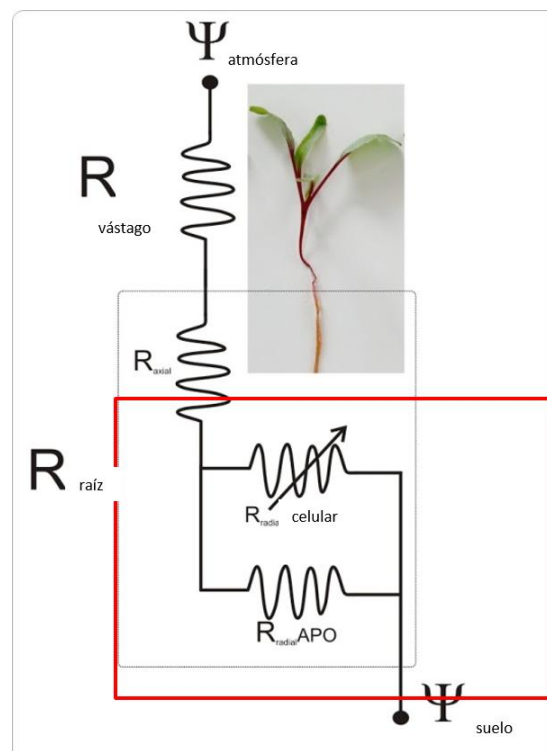
Conclusión

- Dentro de las primeras 24 h, las plantas de *Beta vulgaris* se encuentran en la fase osmótica de la tolerancia al tratamiento salino.
 - La recuperación del fenotipo turgente está asociada al ajuste osmótico de la osmolalidad de la savia en la hoja.
 - En las primeras 4 h, la falta de turgencia observada fue compatible con el gradiente de potencial hídrico favorable para la salida de agua desde el interior de la planta hacia el medio externo.

- El fenotipo poco turgente observado está asociado a un cambio no superior al 2 % en el contenido de agua de la hoja.
- Ante el tratamiento salino, tanto la conductancia estomática en la parte aérea como la conductividad hidráulica de la raíz se redujeron en un ≈ 80 % respecto de las plantas control.
- Los perfiles de recuperación de g_s evidenciaron que el efecto de los cationes en la parte aérea fue equivalente.
- Los perfiles de recuperación de la L_{pr} evidenciaron el efecto diferencial en la raíz de los cationes utilizados y por lo tanto, evidencian la participación del sistema celular como mediador.

Capítulo 2

Caracterización del rango de ajuste dinámico de la conductividad hidráulica de la raíz en *Beta vulgaris* ante el incremento de la salinidad del medio



Introducción

1. Las características del Continuo Suelo - Planta - Atmósfera

A lo largo del continuo suelo-planta-atmósfera (SPAC) y en la planta, el movimiento de agua en la planta se propone como un sistema en estado estacionario donde la tasa de movimiento de agua es la misma a lo largo de todo el individuo. En el estado estacionario el flujo de agua (dm/dt) se comporta como la corriente eléctrica en un circuito y los diferentes órganos de la planta constituyen una sucesión de elementos resistivos (van den Honert, 1948). Por lo tanto, la cantidad de agua transpirada por la planta sería un buen estimador de la masa de agua que debe ingresar a través de la raíz por unidad de tiempo. En este circuito hidráulico, la diferencia de presiones que promueven el movimiento de agua desde la raíz hacia la hoja depende de la diferencia de potencial hídrico entre el suelo y la atmósfera ($\Delta\Psi_{\text{suelo-atm}}$).

El ascenso del agua a lo largo de la planta ocurre principalmente como consecuencia de la tensión generada en la hoja cuando se produce la transpiración de la planta. A lo largo del sistema hidráulico, la contribución de cada órgano de la planta se evalúa a partir de la conductividad hidráulica (L_p), relacionada matemáticamente en forma inversa con la resistencia que el órgano ofrece al pasaje de agua ($L = \frac{1}{R}$). En el marco del sistema hidráulico planteado, se entiende cada una de estas resistencias como una resistencia variable que modula el estado hídrico de la planta y que se modifican para sostener el flujo de agua involucrado en el metabolismo de la planta.

2. El modelo compuesto y la analogía eléctrica del circuito

En la Introducción de esta Tesis se presentó el modelo que describe los dos caminos principales involucrados en el pasaje de agua por la vía radial (**Figura 1**): el apoplasto y la vía celular. Ambos caminos se encuentran anatómicamente dispuestos en paralelo en la vía radial. Entre dos puntos a igual temperatura en el circuito, el gradiente de potencial hídrico que promueve el movimiento de agua a lo largo de la vía radial está constituido por un componente osmótico ($\Delta\Psi_{\pi}$) y un componente de presión ($\Delta\Psi_p$) (Kirkham, 2002)¹³.

$$\Delta\Psi = \Delta\Psi_{\pi} + \Delta\Psi_p$$

Ecuación 2

¹³ Se descarta el componente gravitacional dado que en esta Tesis se trabajó con plantas de porte pequeño.

A partir de la ecuación de flujo, si se expresa el componente osmótico del gradiente de acuerdo con la Ley de Van't Hoff, se obtiene que el flujo a través de la raíz se puede expresar según la ecuación:

$$J_v = L_{pr} [\sigma RT (C_i - C_o) + (\Psi_{pi} - \Psi_{po})]$$

Ecuación 3

Donde,

J_v : el flujo de agua por unidad de peso seco de la raíz (densidad de flujo)

L_{pr} : la conductividad hidráulica de la raíz

C_o : osmolalidad de la solución en el punto 0

C_i : osmolalidad de la solución en el punto i

Ψ_{pi} : potencial de presión en el punto i

Ψ_{po} : potencial de presión en el punto 0

σ : coeficiente de reflexión

R : constante universal de los gases ideales

T : temperatura absoluta

La Ley de Ohm para los circuitos eléctricos propone a la resistencia (R) como la constante de proporcionalidad entre ΔV y la corriente eléctrica. En cambio, en la ecuación de flujo para el movimiento de agua en la raíz, la conductividad hidráulica no es una propiedad completamente independiente de la demanda transpiratoria en la parte aérea que determina el flujo. El coeficiente de reflexión¹⁴ (σ) incluido en la expresión es el elemento que distingue entre la contribución relativa de cada una de las fuerzas impulsoras. Mientras que el flujo de agua a través del apoplasto se mueve como consecuencia del gradiente de potencial de presión, ($\Psi_{pi} - \Psi_{po}$), en la vía celular el flujo de agua y solutos depende del gradiente osmótico, ($\sigma RT (C_i - C_o)$). Por lo tanto el σ refleja la especificidad de las membranas asociado a la permeabilidad a los iones o solutos involucrados.

Anteriormente se ha mencionado que el modelo compuesto propone para una situación de déficit hídrico, que la modulación de la L_p de la raíz (L_{pr}) estaría mediada por un *switch*¹⁵ entre el modo hidráulico y el modo osmótico dado por una barrera puramente física que se atribuye a la suberización de la endodermis o exodermis. En las raíces de maíz, cuya longitud supera los 2 mm, se ha reportado que el principal elemento resistivo del sistema está formado por la endodermis (Frensch *et al.*, 1996). Sin embargo, en el capítulo anterior, se ha mostrado que L_{pr} ya se encontraba inhibido

¹⁴ Este coeficiente toma valores entre 0 y 1, siendo 1 cuando el soluto no es permeable a la membrana.

¹⁵ El modelo compuesto propuesto por Steudle utiliza el término *switch* aludiendo al estado encendido o apagado de la tensión desencadenada por la demanda transpiratoria en la hoja.

cuando la barrera física propuesta por el modelo compuesto (deposición de suberina) se comenzó a detectar (después de 24 h de tratamiento).

En un circuito eléctrico sencillo que resume lo expuesto, dos resistencias óhmicas asociadas en paralelo se encuentran bajo la misma diferencia de potencial. El flujo eléctrico a través de las mismas se distribuye proporcionalmente de acuerdo a lo resistivo de cada camino, es decir, en el camino menos resistivo se registra mayor intensidad de corriente. En este arreglo de resistencias la presencia de una resistencia variable afecta la resistencia equivalente del circuito tal que, la resistencia variable favorece la conducción total del sistema cuando disminuye o, en sentido contrario, aumenta la resistencia total cuando se incrementa. En este sistema, si la resistencia variable fuera muy baja se produciría un estado de máxima conducción a través de este camino, en términos eléctricos esta situación puede resultar en un cortocircuito. En forma análoga, una resistencia variable mucho más grande incrementa tanto la resistencia total que el flujo de corriente se movería exclusivamente por la resistencia menor. En consecuencia, un sistema formado por resistencias en paralelo se caracteriza por un estado de máxima y mínima conducción de corriente, donde la máxima conducción está limitada por el valor de la resistencia menor.

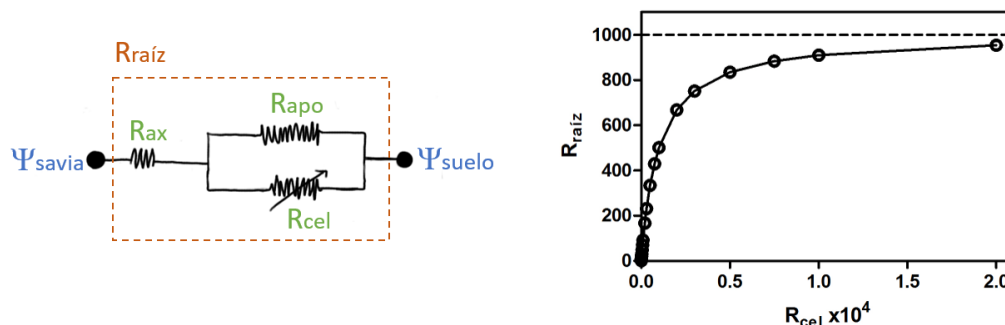


Figura 14: La analogía eléctrica del circuito hidráulico en las raíces. La resistencia total que ofrece la raíz ($R_{raíz}$) al movimiento de agua, es consecuencia del arreglo de resistencias conformado por la vía axial (R_{ax}), el camino del apoplasto (R_{apo}) y la vía celular (R_{cel}). En el gráfico de la derecha se representa el efecto que tienen la variación de la vía celular en $R_{raíz}$. Los valores de los ejes corresponden a un valor relativo de la resistencia respecto a R_{ax} , que se propone como mínima en la literatura.

En este contexto, cabe preguntarse si las características descriptas para el circuito eléctrico constituyen una representación válida del sistema de resistencias presente en las raíces de las plantas. En la literatura se representa la resistencia de la raíz como un conjunto de tres resistencias: la resistencia axial en serie a un arreglo de resistencias en paralelo formado por la resistencia del apoplasto y la resistencia de la vía celular (Steudle & Peterson, 1998; Knipfer & Fricke, 2011). En este sistema la única resistencia variable a tiempos cortos sería la resistencia celular, y la resistencia axial sería despreciable frente a la resistencia radial (**Figura 14: La analogía eléctrica**

del circuito hidráulico en las raíces.). Bajo estos supuestos cabe preguntarse ¿cuál es el rango dinámico de ajuste para la resistencia equivalente de la raíz a partir de la modulación de sus componentes? ¿cómo contribuye al ajuste total del sistema planta entera?

3. Antecedentes

Los resultados presentados en el primer capítulo han mostrado que la misma capacidad funcional (L_{pr}) estaba asociada a fenotipos muy diferentes e incluso a diferente suberización de la raíz de plantas de *Beta vulgaris* cultivadas en un sistema hidropónico y que fueron sometidas a un cambio de potencial hídrico por agregado de sales (NaCl o KCl). En el contexto de la bibliografía los niveles de inhibición reportados en este modelo vegetal corresponderían a la condición de resistencia máxima de la raíz. A partir de los resultados surgen como posibles interrogantes: *¿La reducción de L_{pr} cumple un rol fisiológicamente relevante evitando la pérdida de agua? ¿La reducción de la eficiencia para mover agua a través del órgano determina un incremento en la resistencia tanto para la entrada como para la pérdida de agua? ¿Cuál es el rango dinámico de ajuste de L_{pr} en *Beta vulgaris*? ¿Cómo participa la vía celular en la modulación de L_{pr} ?*

Bajo las suposiciones del modelo compuesto, la modulación del pasaje de agua a través de la raíz está directamente asociada a la demanda transpiratoria y la naturaleza del gradiente de potencial hídrico a través de la planta. Se propone que, dada la propuesta de vías paralelas en la raíz, la capacidad de modulación de L_{pr} estaría limitada por un valor máximo y mínimo que determinarían la tolerancia de *Beta vulgaris*. El rango dinámico de ajuste de la conductividad hidráulica en tratamientos salinos evidencia la contribución de la vía celular cuando el tratamiento salino es de 4 h¹⁶, en ausencia de la deposición de suberina en la endodermis.

4. Diseño experimental

Siguiendo el protocolo de germinación y cultivo descrito en el Capítulo 1, se diseñó un protocolo experimental donde las plantas estuvieron 4 h en un medio con NaCl. Se realizaron determinaciones de las propiedades hidráulicas tanto de la raíz como de la parte aérea. La estrategia para modular el gradiente de potencial hídrico a lo largo del SPAC fue probar un rango amplio de concentraciones crecientes (0-200 mM

¹⁶ Los resultados presentados en el primer capítulo han mostrado que después de 24 h de tratamiento se produce una modificación en la deposición de suberina que modificaría la resistencia radial alterando el apoplasto.

NaCl) para evaluar la respuesta en todo el rango en lugar de utilizar una concentración fija de NaCl. La reducción del potencial hídrico del medio (Ψ_{medio}) mediante el agregado de NaCl afecta la fuerza impulsora que promueve el ingreso de agua a la planta. Se analizaron plantas desarrolladas en el sistema hidropónico para descontar cualquier efecto proveniente de la matriz del suelo entorno a la raíz.

5. Objetivo general

Determinar el rango de ajuste de la conductividad hidráulica de la raíz de *Beta vulgaris* en el sistema de cultivo hidropónico ante el incremento de la salinidad.

Objetivos específicos

- Determinar g_s en plantas de *Beta vulgaris* en un rango amplio de tratamientos salinos (0, 50, 100, 125, 150, 200 mM de NaCl)
- Determinar L_{pr} en plantas de *Beta vulgaris* en un rango amplio de tratamientos salinos (0, 50, 100, 125, 150, 200 mM de NaCl)
- Caracterizar la contribución de los caminos propuestos en la raíz en la modulación de L_{pr}
 - Determinar la conductividad osmótica de la raíz (L_{po}) para discernir la contribución celular al pasaje de agua
 - Evaluar la contribución de la vía no celular (el apoplasto) utilizando un método colorimétrico

6. Descripción del protocolo utilizado

El protocolo consistió en someter las plantas cultivadas durante 21 días a diferentes tratamientos donde se incrementó la salinidad del medio (SH) con NaCl en el sistema hidropónico descrito en Materiales y Métodos (Sección 1). Esta estrategia se implementó para evaluar las propiedades hidráulicas y su capacidad de ajuste en este modelo vegetal en el rango de concentraciones probadas (0 a 200 mM). En estas condiciones se caracterizaron el estado hídrico y las propiedades hidráulicas de acuerdo a como se esquematiza en la **Figura 15**.

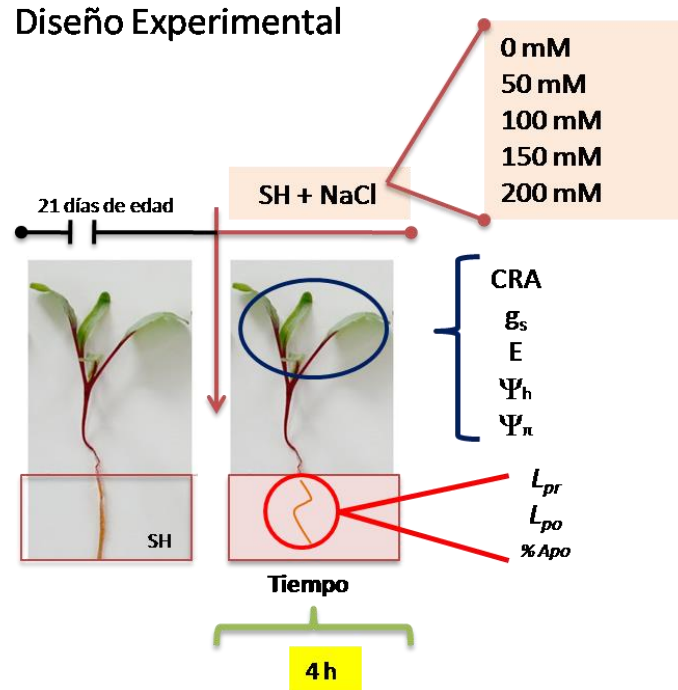


Figura 15: Breve descripción del diseño experimental y metodología aplicada en este Capítulo. Las plantas de remolacha de 21 días de edad recibieron en la solución Hoagland (SH, composición en la **Tabla 7**) del sistema hidropónico la masa de NaCl suficiente para generar una concentración final en la solución del medio de, 50, 100, 150, 200 mM de NaCl respectivamente. Se mantuvieron las plantas en este medio por 4 h, y luego se cosecharon para caracterizar cómo se habían modificado los parámetros de acuerdo al esquema de esta **Figura**. En todos los experimentos independientes un conjunto de plantas se mantuvo en la SH sin suplementar con NaCl (0 mM), como controles del ensayo. En el vástago de las plantas de *Beta vulgaris* se determinó: i. CRA: contenido relativo de agua de la hoja; ii. g_s : conductancia estomática; iii. E: tasa transpiratoria foliar; iv. Ψ_h : potencial hídrico en la hoja; v. Ψ_π : potencial osmótico de la hoja. En las raíces de *Beta vulgaris* se determinó: vi. L_{pr} : conductividad hidráulica de la raíz; vii. L_{po} : conductividad osmótica de la raíz; viii. % Apo: porcentaje del flujo transportado a través de la vía apoplástica en la raíz.

Resultados

1. Caracterización del estado hídrico en diferentes condiciones de salinidad

Para abordar la caracterización de la capacidad de ajuste hidráulico de las plantas de *Beta vulgaris*, el medio de crecimiento (SH) fue suplementado con NaCl en diferentes concentraciones (0 a 200 mM).

A lo largo del tiempo de los experimentos no se observaron diferencias entre las plantas en SH y aquellas en SH + 50 mM de NaCl. Las plantas en cultivo hidropónico que fueron tratadas con 100 mM, 150 mM y 200 mM de NaCl presentaron un cambio en el fenotipo en las primeras 4 h de tratamiento. En el tratamiento SH + 100 mM de NaCl sólo el 30% de la población se vio afectada, en tanto el tratamiento SH + 150 mM de NaCl determinó que el 71% de las plantas mostraron esta pérdida de turgencia. Después de cuatro horas de aplicado el tratamiento, el 100% de las plantas

en el medio SH + 200 mM de NaCl presentaron una pérdida de turgencia como se mencionó en el capítulo anterior. Por lo tanto, dentro de las primeras 4 h del tratamiento la proporción de plantas con un fenotipo poco turgente se incrementó cuando se aumentó la concentración de NaCl suplementado. Después de 24h de aplicado el tratamiento, todas las plantas mostraron un fenotipo turgente incluso aquellas que se encontraban en SH suplementada con NaCl, como se ha descrito en el Capítulo 1.

Se evaluó el ajuste de los parámetros hidráulicos en las primeras horas del tratamiento para evidenciar los mecanismos rápidos ligados a la tolerancia esto es antes de que se desarrollen las modificaciones a largo plazo (e.g. deposición de suberina). Se verificó el efecto del tratamiento sobre las plantas de *Beta vulgaris* a largo plazo. En el sistema hidropónico las plantas pudieron desarrollarse aún en condiciones de elevada salinidad mostrando después de una semana los primeros signos que en la literatura se describen como de toxicidad (Munns & Tester, 2008; Negrão *et al.*, 2016). Se observaron depósitos de cristales en las hojas de las plantas tratadas con 100 mM de NaCl y la senescencia de las hojas cotiledonales en las plantas tratadas con 200 mM de NaCl. A los 8 días de tratamiento se observó un significativo enlentecimiento del crecimiento asociado a una menor expansión foliar en las plantas en SH + 150 mM NaCl y SH + 200 mM NaCl (**Figura 40**, Anexo).

Al analizar el estado hídrico se observó que después de 4 h de tratamiento, sólo las plantas tratadas con SH+200 mM de NaCl mostraron una reducción estadísticamente significativa (Tukey, $p < 0.05$) del contenido relativo de agua (CRA) respecto a las plantas en el medio SH (**Figura 16 A**). Entre los tratamientos salinos no se observaron diferencias significativas en cuanto al CRA incluso cuando se observaron diferencias en el fenotipo turgente. No se observaron diferencias significativas en los valores de potencial osmótico (Ψ_{osm}) de plantas sujetas al tratamiento y plantas control (0 mM de NaCl= SH) después de 4 h de iniciado el tratamiento (**Figura 16 B**). En cambio, el potencial hídrico del xilema (Ψ_h), determinado a través de la cámara de Scholander, presentó valores significativamente menores (Tukey post test) con respecto al de las plantas control cuando el medio fue suplementado con 100 mM de NaCl o concentraciones superiores (**Figura 16 C**). Estas observaciones son compatibles con otros reportes donde se ha caracterizado la respuesta de *Beta vulgaris* en otras condiciones de crecimiento y estadíos de desarrollo y donde se ha propuesto que el umbral osmótico sería 50 mM en esta especie (Ashraf *et al.*, 2008). Cabe destacar, que es posible observar una tendencia en ambos potenciales a tornarse aún menores ante el incremento de NaCl del medio.

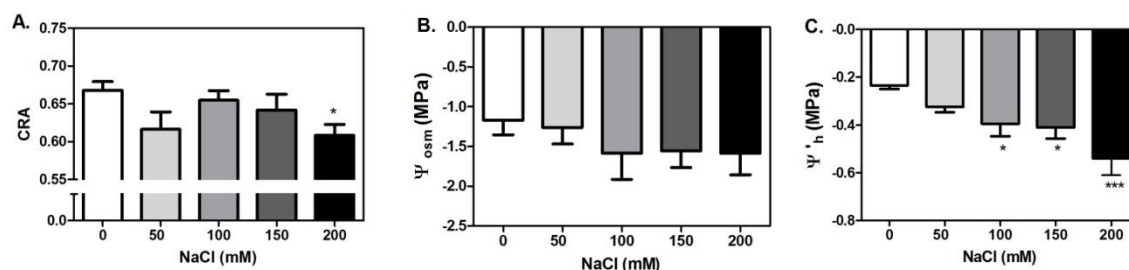


Figura 16 : Estado hídrico de las hojas después de 4 h de tratamiento. **A.** El contenido relativo de agua, CRA, de las plantas tratadas con diferentes concentraciones de NaCl (* $p < 0.05$, Tukey). **B.** El potencial osmótico (Ψ_{osc}) en las hojas de las plantas no mostró ser un parámetro afectado después de 4 h de tratamiento. **C.** El potencial hídrico (Ψ_h) de la hoja en plantas tratadas con las diferentes concentraciones de NaCl (* $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, Tukey). En los resultados se presenta la media \pm SEM de un total de n:3 experimentos independientes, la concentración de sal suplementada a SH se indica en el eje de las abscisas.

Se procedió a determinar las mismas propiedades en las plantas sometidas al tratamiento por 24 h, cuando el fenotipo observado fue indistinguible entre los tratamientos y las plantas en SH. Las propiedades asociadas al estado hídrico se compararon respecto a plantas de la misma edad en el medio SH (0 mM NaCl). Las determinaciones del CRA y el Ψ_{osc} , presentaron las mismas características que en el tratamiento aplicado por 4 h como puede observarse en la **Figura 17 A y B**. En particular, el Ψ_h' fue significativamente menor en las plantas tratadas por 24h con 150 mM y 200 mM de NaCl respecto a las plantas control (0 mM de NaCl, **Figura 17 C**).

Ante la menor disponibilidad de agua en el medio, las plantas de *Beta vulgaris* desencadenaron una estrategia tolerante que involucra principalmente Ψ_h' . La reducción observada en el Ψ_h' de los haces vasculares sugiere que parte de la estrategia está ligada a mantener un gradiente favorable para el ingreso de agua desde el suelo (en este caso el medio de SH). A partir de los valores de Ψ_h' determinado en las hojas de *Beta vulgaris*, y el Ψ_h del medio calculado a partir de la osmolalidad¹⁷ de las soluciones, se determinó el gradiente de potencial hídrico efectivo ($\Delta\Psi_{x-s} = \Psi_h' - \Psi_s$) entre el xilema y el medio (SH +/- sales agregadas) en que se encuentran las raíces (**Figura 18**).

¹⁷ Ver características de la metodología en Materiales y Métodos.

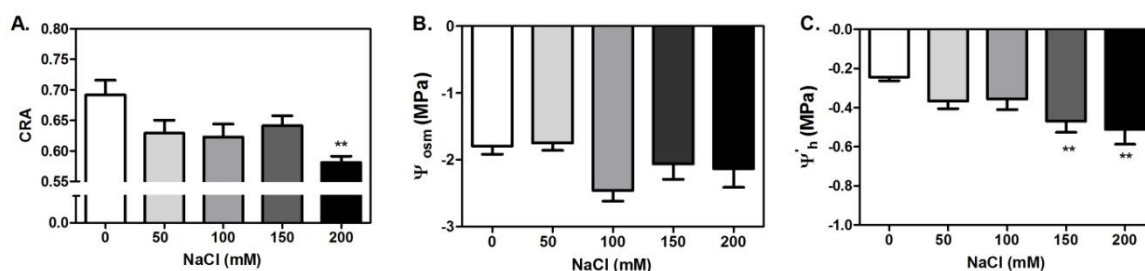


Figura 17: Estado hídrico de las hojas después de 24 h de tratamiento. **A.** El contenido relativo de agua, CRA, de las plantas tratadas con 200 mM de NaCl en SH (** $p < 0.05$, Tukey). **B.** El potencial osmótico, Ψ_{osm} , en las hojas de las plantas no mostró ser un parámetro afectado después de 24 h de tratamiento. **C.** El potencial hídrico, Ψ_h , fue el parámetro más sensible al tratamiento de 24 h (** $p < 0.05$, Tukey). En los resultados se presenta la media \pm SEM de un total de n:3 experimentos independientes, la concentración de sal suplementada a SH se indica en el eje de las abscisas.

A partir del cálculo del nuevo gradiente de potencial hídrico ($\Delta\Psi_{x-s}$) entre el xilema (Ψ_h) y el suelo (Ψ_s), se clasificó el diseño experimental en tres fases (**Figura 18**):

- i. En el tratamiento control (SH+0 mM de NaCl) y el tratamiento 50 mM de NaCl, $\Delta\Psi_{x-s}$ resultó menor que cero y no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Por lo tanto, en ambos casos el gradiente de potencial hídrico obtenido favorece el ingreso desde el suelo hacia la vasculatura (**Figura 18**, indicado con la letra a)
- ii. En el tratamiento con 100 mM de NaCl, $\Delta\Psi_{x-s}$ resultó despreciable o nulo. En este caso las plantas carecieron de un gradiente de potencial hídrico efectivo entre el suelo y el xilema que promueva el ingreso de agua desde la SH.
- iii. Los tratamientos donde SH fue suplementada con 150 mM y 200 mM presentaron un $\Delta\Psi_{x-s}$ mayor a cero y significativamente mayor al presentado por los otros tratamientos (**Figura 18**, indicado con la letra b). Esta diferencia de potencial hídrico, no favorece el ingreso de agua desde el medio SH hacia la vasculatura. Dado el $\Delta\Psi_{x-s}$ calculado, la pérdida de turgencia observada en las plantas bajo estos tratamientos fue compatible con un flujo de agua desde la vasculatura de las plantas hacia el medio SH.

Es relevante mencionar que la diferencia entre los potenciales del xilema y la SH (solución Hoagland) fue equivalente entre las determinaciones realizadas después de 4 h de tratamiento y/o de 24 h de tratamiento. El tiempo durante el que se realizó el tratamiento no incide significativamente en el ajuste del potencial hídrico (test Anova de dos vías). Esto sugiere que el ajuste del potencial hídrico no sólo es el más sensible al incremento de la salinidad del suelo que una vez que se produce su modulación la sostiene a lo largo de las 24 h evaluadas en estos ensayos.

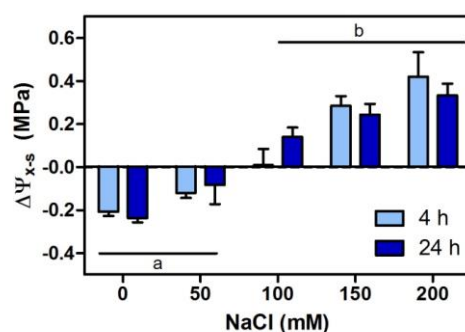


Figura 18: Efecto del tratamiento sobre la diferencia de potencial hídrico ($\Delta\Psi_{x-sh}$) entre la vasculatura y el medio en las plantas de *Beta vulgaris*. Este valor representa la fuerza impulsora efectiva que promueve el movimiento de agua desde el medio hacia la hoja después de 4 h de tratamiento (celeste) o 24 h de tratamiento (azul). Se presenta la media \pm SEM de Ψ_{sh} calculada a partir de experimentos independientes (n:6) realizados para la determinación del Ψ_h . Las letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías, test de Bonferroni. La concentración de sal suplementada a SH se indica en el eje de las abscisas.

2. Caracterización de la respuesta en el vástago ante los tratamientos impuestos

El parámetro g_s está asociado a la pérdida de agua a través de la parte aérea y además es modulado fuertemente por el potencial hídrico (Ψ_h) en la hoja (Buckley, 2005).

Se verificó que el parámetro g_s reflejó las fases propuestas a partir de las determinaciones del potencial hídrico (**Figura 18**). En las plantas control (0 mM NaCl), los valores de g_s fueron (252 ± 11) mmol m⁻² s⁻¹ mientras en las plantas tratadas este valor se redujo en un 60 % hasta ≈ 150 mmol m⁻² s⁻¹ cuando estaban en un medio suplementado con 100 mM o 150 mM de NaCl (**Figura 19 A**). En las plantas tratadas con 200 mM de NaCl después de 4 h de tratamiento, g_s se redujo hasta el (31.1 ± 6.4) % del valor promedio determinado en las plantas control (0 mM NaCl).

En las plantas que estuvieron 24 h en SH suplementada con NaCl, el valor obtenido en 200 mM de NaCl fue el (43.6 ± 5.8) % respecto al valor medio determinado en las plantas control (**Figura 19 B**). Si bien la reducción en g_s en los experimentos que duraron 24 h pareciera menos abrupto que la determinada en los experimentos que duraron 4 h, no se observaron diferencias significativas entre la reducción relativa de g_s después de 4 h o 24 h de tratamiento (**Figura 19 B**). Por lo tanto, cuando las condiciones de potencial hídrico resultaron desfavorables para el ingreso de agua, en las hojas se produjo una reducción significativa de g_s que se mantuvo en el tiempo.

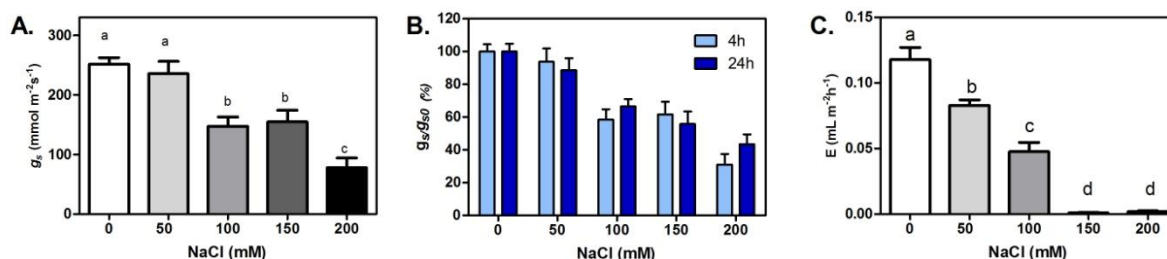


Figura 19: Efecto del incremento de salinidad sobre la pérdida de agua en la parte aérea.

A. Después de 4 h de tratamiento se observó que las plantas cuya SH se había suplementado con 100, 150 o 200 mM de NaCl presentaron una reducción significativa de la conductancia estomática, g_s , respecto de las plantas control. **B.** Comparación de la modificación de g_s en las plantas después de 4 h de tratamiento (celeste) o 24 h de tratamiento (azul). La modificación relativa de g_s en las plantas después de 24 h de tratamiento se redujo en forma semejante a la determinada a las 4 h de tratamiento bajo los tratamientos de 100, 150 o 200 mM de NaCl. **C.** La tasa transpiratoria, E , se redujo significativamente ante el agregado de NaCl en el medio, siendo máxima la inhibición del flujo en las plantas bajo los tratamientos de 150 mM y 200 mM. Se presentan la media \pm SEM de un total de 3 experimentos independientes, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$, Tukey). La concentración de sal suplementada en SH se indica en el eje de las abscisas.

Es interesante destacar que la modificación de la conductancia estomática que se observó en las plantas después de 4 h de tratamiento no difirió de la respuesta presente en las plantas que fueron sometidas al tratamiento durante 24 h. La tasa transpiratoria (E) se redujo significativamente en las plantas ante el agregado de NaCl en la SH del cultivo hidropónico (**Figura 19**).

3. Caracterización de la respuesta de la raíz ante las tres condiciones impuestas

3.1. Eficiencia de la raíz en el transporte de agua, L_{pr}

La capacidad de la raíz como órgano encargado del transporte de agua a través de las plantas fue caracterizada en las condiciones propuestas a partir de la conductividad hidráulica (L_{pr}). La conductividad hidráulica de la raíz es la conductancia por unidad peso seco de la raíz ($L_{pr} = L_o / P_{S_{raíz}}$).

Los valores promedio de L_{pr} presentaron una reducción significativa cuando la SH fue suplementada con 150 mM y 200 mM de NaCl. Cuando el gradiente para la entrada de agua a la raíz fue favorable o nulo (0-100 mM, fases i y ii, **Figura 18**), en el tratamiento aplicado por 4h, las determinaciones de L_{pr} en las raíces no difirieron significativamente respecto a la capacidad de transporte medida en las plantas sin tratamiento salino (106 ± 21 mL h⁻¹MPa⁻¹ g PS⁻¹). En cambio, cuando el gradiente efectivo de potencial hídrico fue desfavorable para el ingreso de agua a la raíz (150 mM y 200 mM, fase iii), se observó claramente una disminución de la capacidad del

órgano para conducir agua desde el suelo a la vasculatura (50-70) % respecto de las plantas en SH (**Figura 20 A**).

Cuando el fenotipo turgente se recuperó transcurridas 24 h de tratamiento, los niveles de L_{pr} se redujeron cuando la concentración de NaCl fue igual o superior a 100 mM (**Figura 20 B**). Si bien no hubo diferencias significativas en los gradientes de potencial efectivo¹⁸ entre los tratamientos de 4 h y 24 h (**Figura 18**), en el tratamiento más prolongado (24 h) 100 mM NaCl determina un gradiente desfavorable para el ingreso de agua. Los resultados observados en el L_{pr} bajo este tratamiento (24 h, 100 mM NaCl) son compatibles con la condición de un gradiente efectivo que no es favorable. Por lo tanto, L_{pr} es un parámetro suficientemente sensible para evidenciar esta condición que afecta el desarrollo.

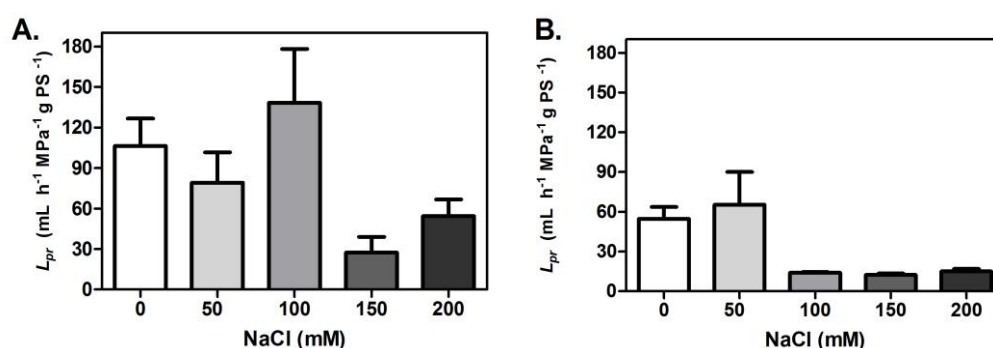


Figura 20: Caracterización de la eficiencia en el transporte de agua de la raíz de *Beta vulgaris* bajo distintas condiciones de salinidad. Se determinó en las raíces de *Beta vulgaris* la conductividad hidráulica de la raíz (L_{pr}). Las plantas se cosecharon después de 4 h (**A**) o 24 h (**B**) de aplicado el tratamiento salino. Se presenta la media \pm SEM de n: 3 experimentos independientes. La concentración de sal suplementada a SH se indica en el eje de las abscisas.

En este sistema experimental se observó que en el rango de concentraciones de NaCl probadas tanto L_{pr} como $\Delta\psi_{x-s}$, presentaron un comportamiento bimodal caracterizado por dos fases: L_{pr} se mantiene elevada cuando $\Delta\psi_{x-s}$ fue favorable para el ingreso de agua, mientras que L_{pr} se reduce significativamente cuando $\Delta\psi_{x-s}$ fue favorable para la salida de agua. En estas condiciones, la capacidad de ajuste radical estaría fuertemente ligada a la capacidad de la planta de regular el potencial hídrico. La disminución de L_{pr} es una estrategia funcional que restringe tanto la entrada de agua desde el medio circundante hacia el resto de la planta desde la raíz, como también evita la pérdida de agua a través de este órgano en condiciones donde el gradiente de potencial hídrico favorezca la salida de agua hacia el medio externo.

¹⁸ Se denomina gradiente de potencial efectivo a la diferencia de potencial hídrico entre el potencial hídrico de la hoja y el potencial hídrico del suelo presentado en la Figura 18. Esta diferencia de potencial estaría involucrada en el gradiente impulsor que promueve el movimiento pasivo de agua desde el medio externo hacia la vasculatura.

Se observó que la respuesta de ajuste de la conductividad en la raíz se modula significativamente como consecuencia de la modificación del crecimiento, cuando el gradiente de potencial hídrico es desfavorable (Fases descritas en la sección previa). Por lo tanto, si el agua se mueve pasivamente desde el interior de la planta hacia el medio externo en la raíz se modifica la capacidad intrínseca para conducir agua cuando el gradiente es desfavorable. De acuerdo con estos resultados, sólo cuando el potencial hídrico del xilema no es lo suficientemente negativo respecto al suelo para mantener el gradiente de potencial favorable para la entrada de agua, la capacidad intrínseca de la raíz (L_{pr}) para transportar agua modifica sus propiedades.

3.2. Componentes involucrados en la modulación del pasaje de agua a través de la raíz

El gradiente de potencial hídrico efectivo entre los haces vasculares en la hoja y el medio es la fuerza impulsora que promueve el flujo pasivo de agua desde el medio externo hacia el interior de la planta. Dada las características presentadas por el L_{pr} se procedió a determinar cuáles son las vías involucradas en el pasaje de agua a través de la raíz cuando se produce el ajuste de la capacidad radical. Este análisis permitiría integrar la respuesta observada frente a la modificación de un gradiente y la consecuente modificación (o no) del L_{pr} .

3.2.1. Evaluación de la contribución de la vía celular: determinación de la conductividad osmótica de la raíz (L_{po})

En primer lugar, se caracterizó el exudado espontáneo de la raíz. Este se considera independiente de la tensión generada por la demanda transpiratoria. Se determinó por lo tanto el componente osmótico (L_{po}) en las raíces en el rango de concentraciones de NaCl propuestas. Para esto se determinaron en raíces control y tratadas con sal: i) el flujo de exudado espontáneo relativizado por unidad de peso seco de la raíz (J_v), ii) el gradiente efectivo a través de la raíz a partir de la diferencia de osmolalidades entre la solución externa y el flujo exudado (ΔOsm), y finalmente iii) la relación entre estos dos parámetros como L_{po} .

Después de 4 h de añadido el tratamiento, las plantas control presentaron J_v promedio de $1.73 (\pm 0.24) \text{ gH}_2\text{O gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que las plantas en medio suplementado con NaCl registraron un decrecimiento del flujo ante el tratamiento con NaCl (**Figura 21 A**). El tratamiento con 200 mM NaCl resultó en una reducción del $25.0 (\pm 3.5) \%$ respecto del flujo medio presente en las plantas control (0 mM NaCl). Esta reducción fue equivalente a la medición obtenida en los restantes tratamientos. Se observó una tendencia que sugiere que es mayor la reducción del flujo cuanto mayor fue el agregado de NaCl, aunque no resultó estadísticamente significativa.

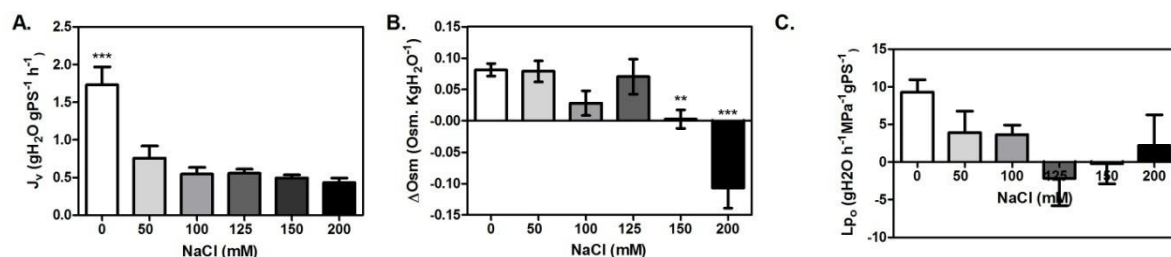


Figura 21: Efecto de los tratamientos aplicados sobre la conductividad osmótica de la raíz (L_{po}) de *Beta vulgaris*. **A.** El flujo exudado en forma espontánea (J_v) se redujo significativamente en las plantas donde el medio había sido suplementado con NaCl. **B.** La diferencia de osmolalidad entre el exudado y la solución SH (ΔOsm) en que se encontraban las plantas fue utilizada como estimador del gradiente que promueve el flujo de agua, en cada tratamiento. **C.** La conductividad osmótica de la raíz (L_{po}) medida en plantas tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. En los resultados se presenta la media \pm SEM de un total de $n=3$ experimentos independientes, la concentración de sal suplementada a SH se indica en el eje de las abscisas (***) $p < 0.001$; * $p < 0.0138$, Tukey).

En este caso, se estimó el gradiente de potencial hídrico efectivo (ΔOsm) a través de la raíz a partir de la diferencia de osmolalidad entre el exudado y la SH en que se hallaban las plantas. Después de 4 h de tratamiento, la diferencia de osmolalidad en las plantas control ascendió a (81 ± 10) mOsm KgH₂O⁻¹, sin diferencias significativas respecto del ΔOsm determinado en las plantas tratadas con 50, 100 y 125 mM de NaCl (**Figura 21 B**). En estos tratamientos, el ΔOsm resultó favorable para el ingreso de agua en forma pasiva desde SH hacia el interior de la planta a través de la raíz. Cuando el medio externo fue suplementado con 150 mM y 200 mM de NaCl, ΔOsm resultó ser nula o negativa. En otras palabras, el gradiente de potencial hídrico efectivo aquí medido no favorecería en estos casos el movimiento pasivo de agua desde SH hacia el interior de la planta. Sin embargo, fue posible determinar un volumen de flujo exudado espontáneo (J_v).

La eficiencia de la vía celular para transportar agua ante la suspensión de la tensión transpiratoria presentó dos estrategias combinadas. Se observó una estrategia asociada a mantener la diferencia de osmolalidad entre el exudado y el medio externo en los tratamientos 0 a 125 mM NaCl, los cuales serían compatibles con las fases i) y ii) propuestas en la sección anterior. En estas fases la planta desencadena una estrategia por la que sostiene la diferencia de osmolalidad incrementando la concentración de solutos en el exudado ante la disminución del potencial de la SH. En tanto, al agregar sal al medio SH, la presencia del catión Na^+ en la solución afecta sensiblemente el J_v , independientemente del gradiente involucrado. Es así que los niveles de L_{po} , (9.3 ± 1.7) gH₂O h⁻¹ gPS⁻¹ MPa⁻¹, en las plantas control (0 mM NaCl) fueron superiores a los determinados en las plantas tratadas con 50, 100 y 125 mM NaCl como consecuencia del efecto del catión sobre el J_v . Los resultados obtenidos

para los tratamientos 150 mM y 200 mM NaCl resultan más complejos de interpretar (**Figura 21 C**).

El método utilizado supone que J_v es consecuencia del movimiento pasivo de agua y que el gradiente que promueve el movimiento deriva de ΔOsm medido. Cuando los tratamientos fueron de 150 o 200 mM de NaCl, los valores calculados de L_{po} resultaron negativos para la mayor parte de las plantas evaluadas. En este caso, el signo negativo es indicador del sentido del flujo derivado del ΔOsm , sugiriendo que el movimiento del agua sería opuesto al medido desde la vasculatura hacia el medio. Por lo tanto, los valores de L_{po} determinados por esta metodología no serían consistentes con el flujo observado. Dado un flujo espontáneo medido en las plantas *hacia* la vasculatura, no se consideró apropiado utilizar el signo del L_{po} como indicador del sentido del flujo (J_v). En la **Figura 21** se presentaron los resultados de aquellas plantas cuya diferencia de osmolalidad fue superior a cero para realizar las determinaciones de L_{po} . En las plantas en las que se ha pudo determinar el L_{po} , bajo los supuestos mencionados, este parámetro aumentó significativamente cuando los niveles de NaCl en el medio fueron de 200 mM (20.03 ± 8.51) g H₂O h⁻¹gPS⁻¹MPa⁻¹.

Se procedió a realizar una serie de controles para evaluar las características del flujo espontáneo obtenido por esta técnica. Se consideraron dos condiciones: a. ausencia del catión; b. inhibición de la vía celular.

El flujo exudado en las plantas luego de finalizar el tiempo de exposición a la sal se caracterizó cambiando la solución salina por SH sin sal. Esta estrategia tuvo por objetivo determinar si efectivamente la modificación en el flujo está asociada a la presencia del ion y, si la modulación mediada por la vía celular es de carácter reversible. Al retirar el catión de SH, el flujo exudado espontáneo de las plantas que habían sido tratadas no presentaron diferencias significativas con respecto a los flujos determinados en las plantas control (0 mM de NaCl) (**Figura 22 A**).

Se verificó que al restaurar las plantas a un medio sin el agregado de NaCl, el flujo exudado en forma espontánea revierte a los niveles de las plantas control. Asimismo, se observó que la diferencia de osmolalidad entre el exudado y la solución externa es equivalente entre las plantas control y las previamente sometidas al tratamiento salino (**Figura 22 B**). La variabilidad observada en la diferencia de osmolalidad después de 1 h de tratamiento puede ser atribuida a la dificultad en eliminar completamente las sales que pueden quedar acumuladas como consecuencia de las modificaciones en el potencial osmótico de la vasculatura.

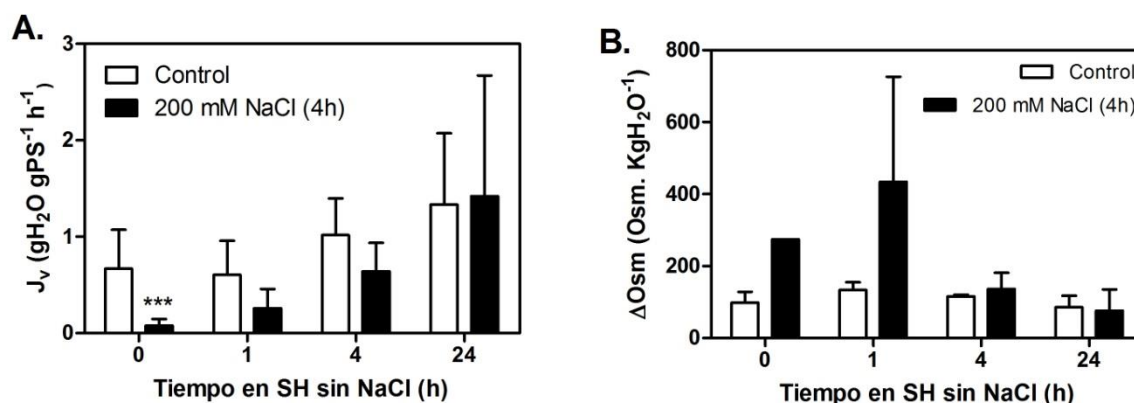


Figura 22: Caracterización del flujo exudado espontáneo (J_v) en la raíz después del tratamiento con NaCl. En las plantas que habían sido tratadas por 4 h con 200 mM NaCl, se reemplazó el medio por SH sin sal y se determinó el flujo espontáneo exudado (J_v) (A) y la diferencia de osmolalidad (ΔOsm) entre el exudado y la SH (B). En los resultados se presenta la media \pm SD de un experimento tipo con 5 réplicas biológicas en cada condición. El tiempo transcurrido en la SH después del tratamiento la concentración de sal suplementada se indica en el eje de las abscisas (***) $p < 0.001$; Test de Student).

Dadas las características de la metodología se analizó si el flujo determinado estaba mediado por la participación de la vía celular como se propone en la metodología elegida (Figura 23). Se incubaron las plantas en presencia de cicloheximida¹⁹, inhibidor de la síntesis proteica que modifica la vía celular (Krieg *et al.*, 1988; Sadok & Sinclair, 2010; Steppe *et al.*, 2012). Las plantas fueron incubadas con 1 μM de cicloheximida en la SH durante el tratamiento con NaCl (4h). El flujo espontáneo exudado por las plantas control (0 mM) y las plantas tratadas con NaCl se redujo significativamente en presencia del inhibidor, sin registrarse diferencias en la osmolalidad del exudado. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la contribución de la vía celular está fuertemente vinculada a la génesis del exudado espontáneo en ausencia de la tensión determinada por la tasa transpiratoria.

¹⁹ Dado los resultados obtenidos en *Beta vulgaris* para otros inhibidores en el primer capítulo, se optó por un agente que afectara la síntesis proteica, y por lo tanto el metabolismo celular y que han sido testeados en raíces de otras especies vegetales.

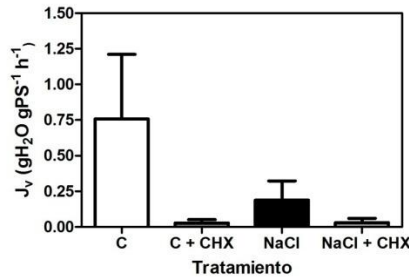


Figura 23: Efecto de cicloheximida (1 µM) en el flujo exudado espontáneo (J_v) en las raíces de *Beta vulgaris*. Se realizó la determinación de J_v en las raíces de plantas que habían sido tratadas previamente con NaCl 100 mM por 4 h en presencia del inhibidor. Se presenta la media \pm SD de un experimento tipo con un total de 11 réplicas biológicas por condición. Resultados preliminares en otras concentraciones de NaCl presentan niveles de inhibición semejantes a los representados en esta **Figura**.

3.2.2. Evaluación de la contribución de la vía apoplástica al flujo de agua en la raíz de *Beta vulgaris*

Se caracterizó la contribución de la vía apoplástica al flujo de agua a través de la raíz utilizando la cámara de Scholander y un marcador de apoplasto (Light green). En las plantas control (0 mM NaCl) la contribución del apoplasto al movimiento de agua a través de la raíz fue del 9 (\pm 4) %. Procediendo de la misma forma se repitió la determinación en plantas donde se había aplicado el tratamiento salino por 4 h (50-125 -200 mM). En la medida que se incrementó la concentración de NaCl en el medio externo se observó una tendencia a la reducción, aunque no significativamente diferente al valor obtenido en las plantas control (Kruskal Willis test, y comparación múltiple de Dunns, $p > 0.05$, **Figura 24 A**).

Los valores obtenidos son inferiores con respecto a los reportados en la bibliografía (Lopez-Perez *et al.*, 2007; Steudle *et al.*, 2007; Kotula *et al.*, 2009; Krishnamurthy *et al.*, 2009). A modo de control acerca del movimiento del colorante entre los espacios intercelulares, las raíces de un *pool* de plantas cultivadas en condiciones control (SH, 0 NaCl) de la misma edad fueron dañadas realizando un corte transversal de las mismas para garantizar la entrada del colorante durante las medidas. Este corte produce una disrupción de la endodermis, exponiendo de esta manera la vasculatura y la vía apoplástica al colorante en forma directa. En estas condiciones es posible estimar la contribución del apoplasto y de la vía axial al flujo total conducido por la raíz. La contribución al flujo total transportado en plantas control alcanzó el (89 \pm 3) %, como indica la barra colorada en la **Figura 24 B**. Así se verificó que el marcador en principio no sería retenido por la vasculatura de las raíces de *Beta vulgaris*. Este resultado respalda los supuestos de la metodología por el cual el colorante puede

desplazarse entre los espacios intercelulares sin significativa adsorción. Asimismo, este resultado verifica las hipótesis presentes en la literatura sobre la baja resistividad que supone la vía axial a la conducción. Para los cuatro tratamientos probados (0, 50, 125, 200 mM NaCl) se verificó que los valores obtenidos fueron significativamente distintos de cero (Prueba de rangos de Wilcoxon, $p \leq 0.05$).

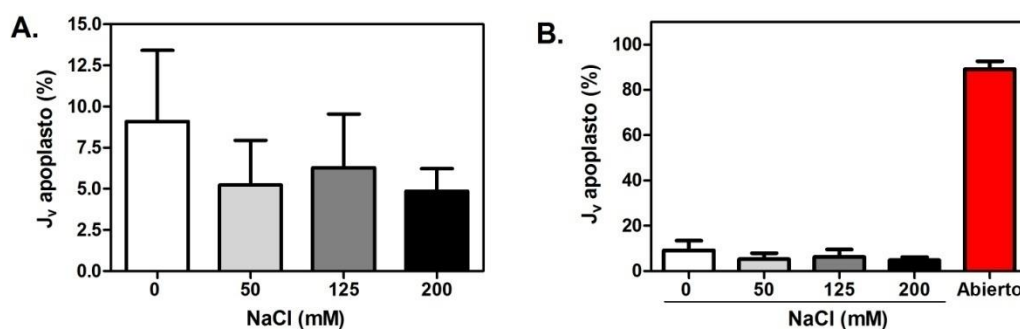


Figura 24: Determinación de la contribución de la vía apoplástica al flujo de agua transportado en las raíces de *Beta vulgaris* después de 4 h de tratamiento. A. El porcentaje de flujo de agua (J_v) que se mueve a través del apoplasto fue estimado a través de la concentración de un marcador específico. En las cuatro condiciones probadas, no se observaron diferencias significativas entre las plantas tratadas con NaCl y las plantas en ausencia de la sal. B. Se presentan los resultados del gráfico A junto a la respuesta medida en las plantas con la vasculatura expuesta intencionalmente (Abierto). Se representa la media \pm SEM de n:3 experimentos independientes. La concentración de sal suplementada a SH se indica en el eje de las abscisas.

En resumen, en las plantas de *Beta vulgaris*, después de 4 h de tratamiento no se observaron diferencias significativas en la contribución de la vía apoplástica al flujo de agua a través de la raíz, esto es en las condiciones experimentales utilizadas el porcentaje de flujo de agua que se mueve a través de la vía apoplástica no se modifica.

¿Cuál es la implicancia de estas observaciones? Por analogía con sistemas simples de cañerías, se entiende que el flujo total transportado por la vía radial (y que representa la contribución de la vía celular) desemboca en la vía axial. Este modelo constituye una simplificación puesto que considera un único plano de la contribución. En tres dimensiones la extensión de la vasculatura y los caminos radiales se mantienen interconectados tanto en el plano horizontal como en el vertical. Explorar en detalle este aspecto requiere de nuevos ensayos y técnicas más sofisticadas, y ha sido abordado con otras estrategias experimentales en algunas especies.

En un tratamiento salino de cuatro horas es posible suponer que no ha habido un cambio en la contribución de la vía apoplástica. De acuerdo a los resultados, en conjunto la vía axial y el apoplasto radial contribuirían con el 89 % del flujo total transportado (se considera que el 11 % restante para completar el total podría atribuirse a la contribución que proviene de la vía celular en las raíces que han sido

cortadas). Cuando se calcula el apoplasto radial solamente, es decir sin tener en cuenta los vasos, los resultados obtenidos sugieren que la contribución al flujo total transportado no superaría el 9 %. Esto implica que no solo tiene un peso muy reducido sino que no se modifica a lo largo de los tratamientos.

Discusión

1. En el rango de concentraciones utilizadas (0-200 mM NaCl), la modulación del Ψ_h impuso tres diferentes condiciones $\Delta\Psi_h$ en las plantas de *Beta vulgaris*

Al igual que las determinaciones realizadas en el primer Capítulo en las plantas de remolacha la primera estrategia asociada a la tolerancia de la salinidad en *Beta vulgaris* es la modulación del Ψ_h . El rango de concentraciones de NaCl utilizadas en los tratamientos aplicados determinaron tres condiciones diferentes o fases: i) diferencia de potencial hídrico ($\Delta\Psi_{H-S}$) que favorece el ingreso de agua a la planta, ii) diferencia de potencial hídrico despreciable o nulo y iii) diferencia de potencial hídrico que no favorece la entrada de agua desde la SH hacia el interior de la planta.

Después de las primeras 4 h de tratamiento los diferentes fenotipos correlacionaron con $\Delta\Psi_{H-S}$ de cada fase donde, ante una condición desfavorable (ii y iii) la turgencia en las plantas disminuyó en los experimentos realizados. Sin embargo, el CRA en las plantas bajo los tratamientos (50, 100, 150 mM) no resultó significativamente diferente respecto a las plantas en condiciones Control (sin agregado de NaCl), aunque mostraron una tendencia a la reducción. Este parámetro en el contexto de las plantas halo-tolerantes como la remolacha no provee la misma información acerca de la estrategia en cuanto al contenido de agua que en plantas glicófitas (Boyer *et al.*, 2008). Se ha observado en diferentes variedades de *Beta vulgaris* que incluso bajo tratamientos prolongados no se observan diferencias significativas en este parámetro (Ghoulam *et al.*, 2002). Además, el protocolo asume que no se producen modificaciones en la concentración de solutos en la hoja (Weatherley, 1950). Por ello si ocurre un ajuste osmótico se produce una subestimación del CRA (Boyer *et al.*, 2008). En otras palabras, la tendencia de reducción del CRA puede atribuirse al ajuste osmótico en la hoja.

2. Cuando el potencial hídrico del entorno desfavorece la entrada de agua, los valores de g_s indican una reducción en la demanda de la parte aérea.

Se evidenció una dependencia entre g_s y el potencial hídrico de la hoja (Franks *et al.*, 2007). En los tratamientos de 150 mM y 200 mM de NaCl, cuando el gradiente efectivo calculado es desfavorable para el ingreso de agua, g_s se redujo a un $\approx 40\%$ de los niveles medidos en las plantas Control mientras que la tasa transpiratoria se redujo mucho más, $\approx 100\%$. Esta estrategia es compatible con los reportes disponibles en la literatura donde se describen la señalización mediada por ABA durante condiciones de estrés abiótico (Fujii *et al.*, 2010; Danquah *et al.*, 2014). Ante la disminución del potencial hídrico del suelo esta hormona media la reducción de la tasa transpiratoria y cierre de los estomas, ABA es el elemento de señalización del potencial hídrico del suelo entre la raíz y la parte aérea (Tardieu & Davies, 1993, 2015; Vandeleur *et al.*, 2014).

3. La modulación de la conductividad hidráulica de la raíz presentó una respuesta bimodal

La participación de la raíz en el sensado del potencial hídrico del suelo para una planta es una respuesta conservada que ha sido demostrada en múltiples ocasiones. En este contexto, en remolacha ante la modificación lineal del potencial hídrico de la solución Hoagland la respuesta en el L_{pr} ha resultado bimodal. En contraste con *Arabidopsis thaliana* (glicófita) donde en el rango de concentraciones evaluadas la conductividad hidráulica ha mostrado una respuesta diferente (**Figura 25**). En el mismo rango de concentraciones de NaCl, la reducción de L_{pr} en *Arabidopsis thaliana* fue máxima ($67 \pm 3 \%$) cuando la concentración de sal añadida es superior a 50 mM. En *Beta vulgaris* la reducción fue significativa cuando el tratamiento superó los 100 mM de NaCl. El rango caracterizado para *Beta vulgaris* en este Capítulo fue semejante al rango disponible en la literatura para *Arabidopsis thaliana*, aunque el *sensado* se encuentra desplazado. En *Arabidopsis* la modificación de L_{pr} en presencia de NaCl no presentaría una respuesta bimodal.

A partir de los reportes de la bibliografía la respuesta obtenida sugiere que la modulación de L_{pr} en *Arabidopsis* alcanza la mínima capacidad de conducción cuando la concentración de NaCl en el medio supera 50 mM. El comportamiento de este parámetro sería posible asociar la máxima inhibición con la capacidad mínima de transporte del sistema hidráulico. En términos de los componentes del circuito, la resistencia sería máxima como consecuencia de la modulación de la vía celular, y el pasaje determinado estaría especialmente ligado al flujo de agua que se mueve a lo

largo de la vía apoplástica. Las diferencias entre ambas especies podrían dar cuenta de la capacidad adaptativa de estas especies a la salinidad. Es necesario realizar nuevos ensayos en diferentes especies en condiciones equivalentes para caracterizar la especificidad del *sensado* y las características del perfil de inhibición.

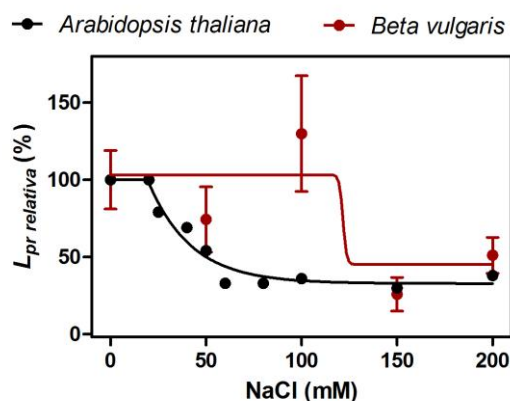


Figura 25: La variación relativa que presenta la L_{pr} en *Arabidopsis thaliana* crecida en cultivo hidropónico comparado con *Beta vulgaris*, en presencia de NaCl. A partir de los reportes de la bibliografía y los resultados en esta Tesis, se construyó este gráfico donde se representó la L_{pr} relativa (%) a los niveles determinados en las plantas sin NaCl añadido. En el gráfico, círculos negros representan la respuesta en *Arabidopsis thaliana*; los círculos rojos corresponden a los resultados de *Beta vulgaris*. Fuentes: (Boursiac *et al.* 2005; Martínez-Ballesta, Díaz, *et al.* 2003; Moira Sutka *et al.* 2011).

En las plantas bajo tratamiento salino, es posible estimar a través de la tasa transpiratoria que la conductividad hidráulica total siempre presenta una marcada reducción. Sin embargo, la L_{pr} en la raíz sólo se vio comprometida en los tratamientos donde el gradiente efectivo fue *desfavorable* para la entrada de agua desde el suelo hacia la vasculatura (fase ii y iii). Así, se pone en evidencia la importancia de la raíz y su íntima relación con el gradiente de potencial hídrico a lo largo de la planta. Estos resultados sugieren que, si bien es importante el gradiente hidráulico para el movimiento de agua a través de la raíz, la modificación de la fuerza impulsora (cambio en la diferencia de potencial hídrico) es tan relevante para la modulación de L_{pr} como para el ajuste de la tasa transpiratoria.

Bajo la suposición del modelo eléctrico, la presencia de una resistencia variable en paralelo determina para el circuito un perfil de modulación como el representado en la **Figura 14**. En este caso, el comportamiento bimodal de la conductividad hidráulica sugiere un circuito más complejo, al menos en el rango de concentraciones de NaCl probadas. L_{pr} presentó un estado de máxima conducción y un estado de mínima conducción, observándose una variación relativa entre ellos del 50 %. En este contexto es necesario dilucidar cómo será el arreglo entre las resistencias involucradas en la modulación de la raíz. Al igual que el modelo compuesto los resultados sugieren una respuesta de modulación del tipo llave o *switch* (encendido

– apagado). Este switch no puede explicarse a través de un cambio anatómico como el propuesto por Steudle dado que en la escala temporal (4 h) no habría modificación de la deposición de suberina (Capítulo 1). Es posible que otros mecanismos presentes que no están siendo considerados estén involucrados para repensar el circuito en plantas que tienen una mayor plasticidad.

4. El movimiento de agua en la raíz a lo largo de la vía radial está modulado por la vía celular

4.1. La contribución del apoplasto radial al flujo total que transporta la raíz fue del 9 % en el rango de concentraciones analizado

En particular, el análisis de la contribución de la vía apoplástica radial al movimiento de agua a través de las raíces de *Beta vulgaris* resultó llamativo. A diferencia de otros reportes en la literatura (Lopez-Perez *et al.*, 2007; Steudle & Ranathunge, 2007; Krishnamurthy *et al.*, 2009), la contribución del apoplasto al flujo total que puede transportar la raíz fue solo del 9 %. También se verificó que la contribución de la vía apoplástica no se modifica dentro de las 4 h de tratamiento aplicado lo cual es coherente con los resultados presentados en el primer Capítulo para la suberización (Capítulo 1). Esto implica que en condiciones donde el flujo total de agua a lo largo de la planta y por ende de la raíz se reduce, la proporción de las vías se mantendrá siempre que exista un gradiente de potencial hídrico. A diferencia de otros reportes, es llamativo que la contribución de la vía celular y la vía apoplástica sea equivalente en la conducción del flujo a lo largo de la raíz (11 % y 9%, respectivamente).

Después de 4 h de tratamiento la capacidad de transporte total en las raíces (reflejada en la conductancia, L_o) no presentó diferencias significativas. Por lo tanto, puede adjudicarse que el 9% del flujo transportado está efectivamente mediado por la vía apoplástica. Si el 9% del flujo de la raíz se mueve a lo largo del apoplasto, entonces bajo las suposiciones del modelo compuesto en condiciones de alta demanda transpiratoria, la raíz sería capaz de satisfacer la demanda transpiratoria solo utilizando el 9% de su capacidad máxima²⁰, puesto que no intervendría la vía celular.

²⁰ Las mediciones de L_{pr} en la cámara de Scholander proveen información acerca de la capacidad máxima de transporte de la raíz. Por lo tanto, no implica que *in vivo* éstas sean las propiedades funcionales *antes* de realizar la cosecha del material para su medición.

4.2. La contribución de la vía celular se reduce independientemente del gradiente de potencial hídrico, y sostiene un flujo mínimo en la raíz durante el tratamiento con NaCl

Si tomamos en cuenta el cálculo de la vía celular en función de las determinaciones de L_{po} , se puede observar que su contribución a la capacidad de conducción de la raíz resultó extremadamente sensible a la presencia de NaCl en la SH. Esto es, independientemente de la concentración en el medio externo, se redujo el flujo exudado por unidad de peso seco que corresponde a la vía celular (**Figura 23**). Por lo tanto, la reducción del potencial hídrico del medio externo afecta directamente al flujo exudado por la vía celular. En muchos ensayos, no fue posible determinar el L_{po} bajo la suposición de que el gradiente de potencial hídrico asociado estaba mediado por la diferencia entre el potencial del exudado y el del suelo. Es llamativo sin embargo que el movimiento mediado por esta vía no puede ser explicado por únicamente un transporte pasivo en esta fase del tratamiento.

En contraste con las determinaciones de L_{pr} , que representa las propiedades intrínsecas de conducción por unidad de biomasa, L_{po} es un parámetro asociado a la capacidad *in vivo* del sistema. Dada la diferencia observada entre los dos parámetros es posible proponer como hipótesis *ad hoc* que incluso en condiciones control las raíces de *Beta vulgaris* son capaces de transportar agua utilizando flujos que están muy por debajo de su capacidad máxima. Si las plantas bajo estudio se encuentran en un estado de mínimo trabajo, ¿es posible que esta condición garantice su aptitud tolerante? ¿Es suficiente para desencadenar la respuesta y sostener el metabolismo de la planta? Definitivamente las respuestas a estos interrogantes son primordiales para poder terminar de desentrañar el papel de las relaciones hidráulicas en la halotolerancia de esta especie.

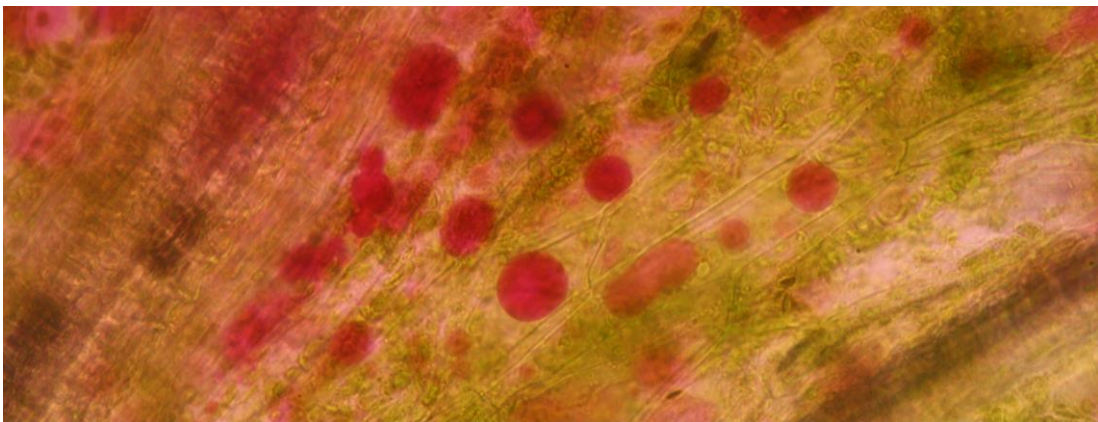
Conclusión

- La modulación de la conductividad hidráulica de la raíz presentó una respuesta bimodal
- El *switch* en el ajuste hidráulico de la raíz está determinado por la inversión en el sentido del gradiente de potencial hídrico (cambia el signo) entre la hoja y el suelo
- La contribución del apoplasto radial al flujo total que puede transportar la raíz fue del 9 % en el rango de concentración analizado

- La contribución de la vía celular se reduce independientemente del gradiente de potencial hídrico, y sostiene un flujo mínimo en la raíz

Capítulo 3

Caracterización de la dinámica del volumen vacuolar en Beta vulgaris



Introducción

En los Capítulos anteriores se mostraron evidencias claras que el camino de agua por la vía celular en la raíz de *Beta vulgaris* puede, en determinadas condiciones, ser partícipe de la dinámica hidráulica de la planta. La redistribución del agua en la vía celular involucra la comprensión de la fuerza osmótica como fuerza impulsora y a la osmorregulación como respuesta celular.

A nivel celular, la osmorregulación cobra un papel esencial en el metabolismo de células animales y vegetales. Tradicionalmente se la define como el conjunto de mecanismos que realiza una célula para controlar el contenido y/o transferencia de agua ajustando la concentración interna de solutos. Este mecanismo forma parte de la respuesta tolerante que se desencadena en las plantas ante modificaciones del potencial hídrico del medio externo²¹ (Morgan, 1984). En los tejidos de los diferentes órganos de una planta, las células vegetales están constantemente expuestas a diferentes gradientes osmóticos y la cinética de estos gradientes está afectada tanto por la localización celular, la organización del tejido, y la ubicación y/o distribución a lo largo del individuo como por limitaciones fisiológicas. Dada la intercomunicación celular presente en muchos de los tejidos vegetales por la presencia de plasmodesmos, resulta particularmente interesante explorar el rol de las organelas como las vacuolas en la osmorregulación y caracterizar por lo tanto las propiedades osmóticas intrínsecas de sus membranas.

1. La modulación del cambio de volumen en distintos sistemas celulares

En las distintas células y bajo condiciones fisiológicas, los cambios de volumen asociados a la osmorregulación pueden durar diferentes intervalos de tiempo. Por ejemplo, las células motoras pulvinares de *Mimosa pudica* pueden reducir hasta un 25% su volumen en cuestión de segundos (Fleurat-Lessard *et al.*, 1997), mientras que en las células de la guarda (estomas) los cambios de volumen en diferentes especies pueden escalar hasta un 40% de su volumen durante decenas de minutos (Raschke & Dickerson, 1973; Franks *et al.*, 2001). Por otra parte, muchos órganos de la planta realizan amplios movimientos rítmicos de crecimiento acoplados a cambios de volumen en células no especializadas, donde las escalas de tiempo son más lentas, reportándose en la literatura valores que se encuentran entre

²¹ Las plantas se encuentran expuestas a diferentes grados de estrés hídrico a lo largo de su ontogenia y desarrollo, lo que implica modificaciones y ajustes en el potencial hídrico a nivel celular. (Morgan, 1984).

decenas de minutos a horas (Jarillo *et al.*, 2001; Siefritz *et al.*, 2004). En las células en crecimiento, los cambios en la turgencia -por ende, en el flujo de agua- son esenciales para el desarrollo (Cosgrove *et al.*, 1981; Steudle & Boyer, 1985). Por lo tanto, como parte de la dinámica del crecimiento y desarrollo de una planta, las células vegetales están también expuestas fisiológicamente a gradientes osmóticos no necesariamente abruptos sino aplicados progresivamente.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los tejidos vegetales se componen de células interconectadas a través de estructuras denominadas plasmodesmos que comunican el protoplasma de células adyacentes. Estudios realizados en estas estructuras -donde se analiza el movimiento de un soluto de alto peso molecular- sugieren que los plasmodesmos permiten una rápida difusión (flujos elevados: 2.5 a 4.1 $\mu\text{m s}^{-1}$ (Rutschow *et al.*, 2011). Incluso algunos autores lo consideran un movimiento casi instantáneo (Beauzamy *et al.*, 2014). Estos resultados contribuyen a considerar que muchos solutos pueden moverse entre células adyacentes sin pasar al apoplasto celular, y que por ende es posible considerar que a través de los tejidos el gradiente osmótico se altera paulatinamente. En particular, en *Beta vulgaris* se ha propuesto el modelo de gradiente de sacarosa para su almacenamiento en la raíz almacenadora. En este modelo, a lo largo del tejido se sostiene una diferencia paulatina en la concentración de sacarosa almacenada entre las células cercanas a los vasos del floema y las que se ubican en el parénquima (Tomos *et al.*, 1992) para garantizar de esta forma su redistribución y almacenamiento. Dado que en el parénquima de la remolacha se han identificado plasmodesmos (Zamski, 1986; Latorre *et al.*, 2010) se puede proponer que en la dinámica de los flujos de agua y solutos la intercomunicación entre células también es un componente importante de la regulación como se ha discutido en los Capítulos anteriores.

2. La vacuola en la célula vegetal

La vacuola central de la célula vegetal es un elemento de la vía simplástica. Ha constituido un modelo de estudio interesante y accesible para entender el proceso de osmorregulación celular, tarea que ha conducido a la caracterización de los transportadores presentes en el tonoplasto y el estudio de las bombas de protones (Shetty *et al.*, 2013; Pottosin *et al.*, 2014). En general, la vacuola ha sido asociada como el sitio de almacenamiento donde se encuentran azúcares, proteínas, aminoácidos y pigmentos (Martinoia *et al.*, 2007, 2012; Müntz, 1998; Pourcel *et al.*, 2010), o donde también se almacenan tóxicos y xenobióticos (Wink, 1997). En las

vacuolas se ha reportado una elevada expresión de acuaporinas tipo TIPs²² – *tonoplast intrinsic proteins*-, que concuerda con la relevancia de esta organela en la homeostasis hídrica (Chrispeels *et al.*, 1994). Este orgánulo puede ocupar el 90 % del volumen celular (Taiz *et al.*, 2015; Deepesh De, 2000) e interviene en el mantenimiento de la turgencia (Matile, 1978). Por ello constituye uno de los componentes esenciales en la homeostasis de la concentración de solutos y agua (MacRobbie, 2006; De, 2000), incluyendo la regulación del pH citosólico (Kulichikhin *et al.*, 2009). En la literatura ha sido ampliamente caracterizado el mecanismo de modulación de la acuaporinas mediado por pH, especialmente la subfamilia PIP²³ (Yanef *et al.*, 2014; Jozefkowicz *et al.*, 2016). En las acuaporinas de tonoplasto (TIPs), este mecanismo pareciera menos conservado y además existen menos evidencias en la literatura que den cuenta acerca de la regulación mediada por pH (Soto *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Leitão *et al.*, 2014).

3. El pH

Si bien en la respiración celular y la fotosíntesis la participación del gradiente de protones es esencial en la síntesis de ATP y reducción de NAD⁺, el rol que el pH desempeña en la dinámica del cambio de volumen vacuolar es un interrogante. En esta aproximación, la dinámica de los cambios de pH se utilizó para evaluar cómo se modifica la dinámica vacuolar cuando la permeabilidad al agua se encuentra comprometida. La vacuola en particular presenta en su membrana la V-ATPasa y un conjunto de transportadores asociados al movimiento de protones -transporte secundario-, por lo que desempeña un papel esencial en la homeostasis del pH (Martinoia *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la cinética de cambio de pH vacuolar es diferente a la del citosol: bajo condiciones de anoxia la acidificación citosólica ocurre dentro de los primeros 30 minutos de tratamiento mientras que en el lumen de la vacuola los cambios son posteriores, y se registran después de 60 -100 minutos de iniciado el tratamiento (Kulichikhin *et al.*, 2009). En conjunto, este desfase en los cambios de pH entre ambos compartimientos contribuye al mantenimiento del potencial de membrana mediado por la concentración de K⁺ en la homeostasis de la célula vegetal (De, 2000; Mac Robbie, 2006).

El estudio de la dinámica del volumen vacuolar asociado al transporte de agua a través del tonoplasto se aborda a partir de la determinación del coeficiente de

²² TIPs deriva del término en inglés, *tonoplast intrinsic proteins*, por tratarse de las acuaporinas que inicialmente se consideraron con ubicación preferencial en el tonoplasto.

²³ PIPs deriva del término en inglés, *plasma membrane intrinsic proteins*, por tratarse de las acuaporinas que inicialmente se consideraron con ubicación preferencial en la membrana plasmática.

permeabilidad osmótica (P_f). Este parámetro es una medida de la capacidad de transporte de agua cuando se somete a la membrana a un gradiente osmótico. En las plantas, existen reportes de P_f de protoplastos²⁴ y de vacuolas aisladas determinados a partir del cambio de volumen inicial que se produce ante una variación casi instantánea en la osmolalidad del medio, esto es desde un medio iso-osmótico a un medio aniso-osmótico (Morillon & Lasalles., 1999; Amodeo *et al.*, 2002; Moshelion *et al.*, 2004; Kuwagata *et al.*, 2007; Sommer *et al.*, 2007). A partir de los modelos empíricos propuestos por Kedem y Katchalsky (1958) se han desarrollado otros modelos que describen la dinámica del transporte de agua ante cambios de gradiente osmótico y el consiguiente cambio de volumen en las células. En estudios con modelos animales se han desarrollado varias aproximaciones especialmente enfocadas en la regulación del volumen celular (Strieter *et al.*, 1990; Hernández y Cristina, 1998; Lucio *et al.*, 2003; para una revisión ver Chara *et al.*, 2011). En particular, las aproximaciones de modelado matemático aplicadas en plantas, estiman las propiedades de los diferentes elementos del sistema a partir de los resultados experimentales obtenidos en protoplastos (Wendlert & Zimmermann, 1985; Moshelion *et al.*, 2004).

4. Antecedentes

Las estrategias experimentales para abordar el estudio de la permeabilidad osmótica de las membranas están ligadas tanto al mecanismo de observación de la organela como al modo en que se modifica el gradiente, tal que estos condicionan la respuesta observada en el cambio de volumen. En el caso de las vacuolas aisladas de remolacha (*Beta vulgaris*), para el mismo cambio de osmolalidad el volumen final alcanzado es diferente de acuerdo a la velocidad con la cual se expone el gradiente, siendo menor en el caso de perfusión continua respecto al cambio abrupto (Sutka 2005, Tesis de doctorado, FCEN). En estudios realizados en vacuolas aisladas de esta especie se reportó que un cambio inmediato de 200 mOsm $\text{Kg}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$ en el gradiente promueve un aumento del 14 % en el volumen de la vacuola en tanto que un cambio promovido por un sistema de perfusión ($430 \mu\text{l min}^{-1}$) desencadena un cambio de volumen de tan solo el 8 % del valor inicial de la vacuola (Amodeo *et al.*, 2002). Este cambio de volumen ha sido caracterizado como sensible a mercurio y a la acidificación del medio externo, alcanzando como volumen final un volumen inferior

²⁴ Protoplasto es la célula vegetal desprovista de su pared celular. Se obtienen en general a través de una digestión enzimática por la que se desintegra la estructura de la pared celular, principal componente del sostén mecánico de la célula vegetal, logrando que el volumen del mismo sea esférico.

al esperado para movimiento de agua a través de la membrana exclusivamente (Amodeo *et al.*, 2002). Si se tratara de un osmómetro ideal, una reducción del 40% en la osmolalidad externa ($490 \text{ mOsm Kg}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$ a $290 \text{ mOsm Kg}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$) hubiera determinado un incremento en el volumen relativo de la vacuola del $\cong 70\%$. Por lo tanto, aun considerando un cambio abrupto de osmolalidad, un aumento de un 14% en el volumen de la vacuola sugiere la presencia de mecanismos compensatorios asociados al cambio de volumen. La hipótesis de partida es que en condiciones fisiológicas, donde los gradientes en el interior celular serían progresivos, se desencadenan en la vacuola mecanismos compensatorios asociados al cambio de volumen junto al flujo osmótico de agua. En primer lugar, podría considerarse que los elementos compensatorios afectarían el gradiente efectivo a través del tonoplasto o que determinan un impedimento físico al cambio de volumen. En ambos casos el volumen final estacionario alcanzado será inferior al predicho por las leyes fenomenológicas de la ósmosis.

5. Diseño experimental

A fin de desentrañar los posibles mecanismos que subyacen a la dinámica de volumen de la vacuola de *Beta vulgaris* en estas condiciones experimentales, se abordó una aproximación de modelado. En esta estrategia, el objetivo no fue simplemente obtener la ecuación que mejor ajuste los resultados experimentales, sino que, como mencionara Fletcher (2011), el modelado provee como principal ventaja que se prueben diferentes hipótesis acerca de los mecanismos involucrados (en este caso, en la dinámica de cambio de volumen vacuolar), y así poder excluir aquellas que no ajusten apropiadamente a los resultados experimentales. Esta aproximación es por lo tanto una herramienta poderosa tanto en la interpretación de resultados experimentales como en el diseño de nuevos experimentos que permitan abordar el problema en estudio. Además, a partir de los ajustes realizados es posible obtener propiedades cuantitativas del sistema como la permeabilidad osmótica de la membrana. En esta Tesis, se construyeron una serie de modelos que permitieran evaluar las posibles hipótesis acerca del cambio de volumen vacuolar.

Las hipótesis se desarrollaron basadas en el resultado experimental previamente reportado donde el cambio de volumen observado era menor al esperado para este sistema si sólo se mueve agua a través de la membrana. En un sistema celular, los cambios de volumen osmóticos no sólo se encuentran afectados por la permeabilidad osmótica de la membrana. *¿Existe un flujo de soluto a través de la organela que disipe el gradiente osmótico a través del tonoplasto?*

Desde un punto de vista mecánico la vacuola como sistema aislado podría pensarse de forma tal que la membrana que la contiene (tonoplasto) representaría a un sólido elástico deformable. Así es que el módulo elástico en esta membrana relaciona la deformación que experimenta por el sistema durante el cambio de volumen dada una tensión ligada a la diferencia de presión en el interior. En estos términos es posible que *¿la elasticidad de la membrana limita los cambios de volumen ante un gradiente osmótico?*

El volumen de la vacuola que se comporta como un osmómetro ideal se denomina volumen osmótico. El volumen osmótico se modifica en forma directamente proporcional con los cambios de presión osmótica del medio externo. Cuando la presión osmótica es infinita, el volumen que presenta la vacuola se denomina volumen no osmótico y no responde linealmente con la osmolalidad externa. En el sistema caracterizado cabe cuestionar *¿la presencia de solutos impermeables en el interior de la organela determina que el volumen osmóticamente activo de la vacuola sea inferior al volumen total de la vacuola?*

6. Objetivo general:

A partir de la elección del modelo más apropiado, se evaluó cuantitativamente la dinámica de cambio de volumen de la vacuola de *Beta vulgaris* bajo los gradientes osmóticos aplicados. Los parámetros provenientes del ajuste de los modelos permitieron estimar propiedades intrínsecas del tonoplasto en vacuolas aisladas que fueron sometidas a un cambio controlado de osmolalidad en una cámara de perfusión diseñada *ad hoc*.

Objetivos específicos

- Caracterizar los cambios de volumen de vacuolas aisladas de *Beta vulgaris* en condiciones aniso-osmóticas
- Desarrollar un modelo que describa la dinámica del volumen vacuolar
- Determinar a partir del ajuste del modelo la permeabilidad osmótica de la vacuola aislada de *Beta vulgaris*
- Analizar la dinámica de volumen vacuolar y el modelo en diferentes condiciones de pH

Metodología

Descripción del protocolo utilizado

Se realizaron ensayos de perfusión con un medio aniso-omótico en vacuolas aisladas, a fin de determinar el cambio de volumen producido por las modificaciones en el gradiente osmótico. A partir de los registros experimentales de cambio de volumen en función del tiempo se realizó el ajuste de los modelos matemáticos propuestos con el objetivo de seleccionar aquel modelo que mejor reproduzca los resultados experimentales. El modelo elegido se evaluó también en dos condiciones experimentales diferentes que permitieron la descripción de la dinámica de cambio de volumen de la vacuola de remolacha. Los detalles de cada uno de los pasos se describen en la metodología, resumidos a continuación en un breve esquema (**Figura 26**).

Diseño Experimental

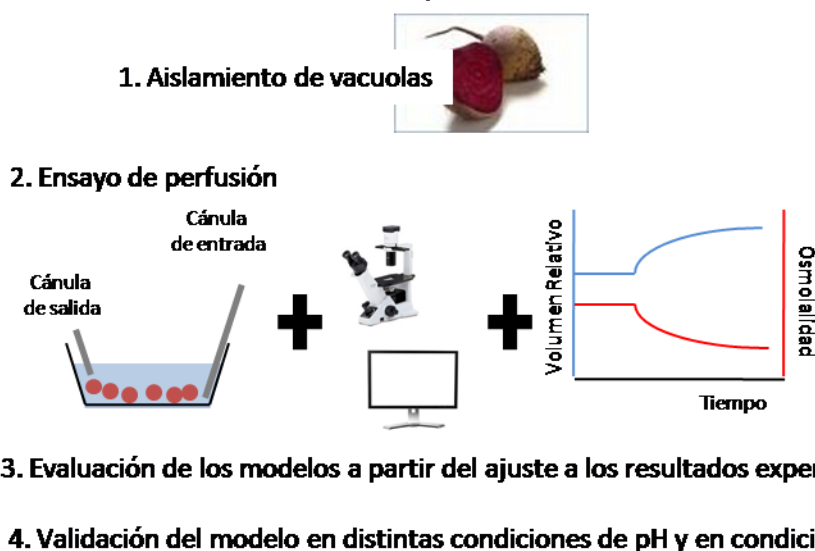


Figura 26: Breve descripción del diseño experimental y la metodología utilizada en el capítulo. 1 y 2. A partir del protocolo de aislamiento de vacuolas descrito en la sección de Metodología se procedió a colocar una suspensión de vacuolas aisladas en una cámara de perfusión montada en un microscopio invertido conectado a una computadora. La cámara de perfusión se diseñó asociada a una cánula de entrada que provee el medio de perfusión. Una llave de dos vías permitió cambiar la composición de la solución con que se perfunde la vacuola. Asimismo, en la cámara se contaba con una cánula de salida conectada a una bomba que succiona el exceso de solución para mantener estable el volumen de la cámara y la distancia focal a lo largo del ensayo. A partir de las imágenes de la vacuola registradas en la computadora se analizó el volumen relativo de la vacuola a lo largo del tiempo del ensayo. Paralelamente, se procedió a determinar la osmolalidad del medio de perfusión a lo largo del ensayo. 3. A partir de los resultados experimentales se procedió a realizar el ajuste de los modelos desarrollados para reproducir el comportamiento de los resultados experimentales. Se compararon los resultados del ajuste obtenidos de la vacuola sometida a un medio hipo-osmótico (HIPO). 4. Se evaluó el modelo elegido, ajustándolo a nuevas condiciones experimentales: a) perfusión en un medio hiper-osmótico (HIPER) y b) perfusión en condiciones HIPO con distinto pH.

Resultados

1. Caracterización del cambio de volumen de la vacuola en condiciones hipo-osmóticas e hiper-osmóticas

La suspensión de vacuolas de *Beta vulgaris* fue sometida a dos tratamientos diferentes según la solución utilizada durante la perfusión: una solución hipo-osmótica (HIPO) o una solución hiper-osmótica (HIPER). El cambio de volumen relativo que se midió en las vacuolas al alcanzar el estado estacionario final presentó marcadas diferencias para ambos tratamientos a pesar de que el cambio de osmolalidad aplicado fue de la misma magnitud, aunque de sentido opuesto (**Figura 27 A**). El incremento en el volumen final observado en condiciones HIPO fue de $(7.9 \pm 0.6) \%$ respecto a la condición inicial mientras en condiciones HIPER las vacuolas presentaron un decrecimiento del volumen de $(17.3 \pm 0.9) \%$ (**Figura 27 B**).

El cambio en el gradiente osmótico fue registrado determinando la osmolalidad del medio a lo largo del tiempo del ensayo en ambos tratamientos. De acuerdo con las características del sistema experimental se ajustó la cinética de cambio de osmolalidad en función del tiempo a una función partida, donde existe una fase inicial estacionaria ($t < 360$ s), seguida de una fase exponencial simple decreciente (HIPO) o creciente (HIPER) según el tratamiento (**Tabla 2**). La cinética de cambio de osmolalidad en función del tiempo en el tratamiento con la solución HIPO fue más lenta que en los tratamientos HIPER a pesar de contar con la misma fuerza impulsora²⁵ y caudal (**Figura 27 C y D**). A partir de los parámetros de la curva exponencial obtenidos del ajuste se determinó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de recambio de la solución de perfusión para cada tratamiento. Después de iniciado el cambio de medio ($t: 360$ s) para el tratamiento HIPO el $t_{1/2}$ de cambio de osmolalidad fue 150 s, mientras que para el tratamiento HIPER el $t_{1/2}$ resultó 20 s (**Figura 27 C y D**). En otras palabras, el tratamiento HIPO produjo un cambio del 50 % de la concentración extracelular recién después de 150 s de realizado el cambio de medio, mientras que el tratamiento HIPER alcanzó un cambio del 50 % después de los primeros 20 s (**Figura 27**).

²⁵ La diferencia de presión necesaria para promover el flujo de solución a lo largo del sistema de perfusión provenía de la diferencia de altura entre la cámara de perfusión y las ampollas cargadas con las soluciones utilizadas. En todos los casos se verificó que el caudal de salida se mantuviera constante y también, la diferencia de altura entre la superficie de líquido en las ampollas y la salida en las cánulas ubicadas en la cámara.

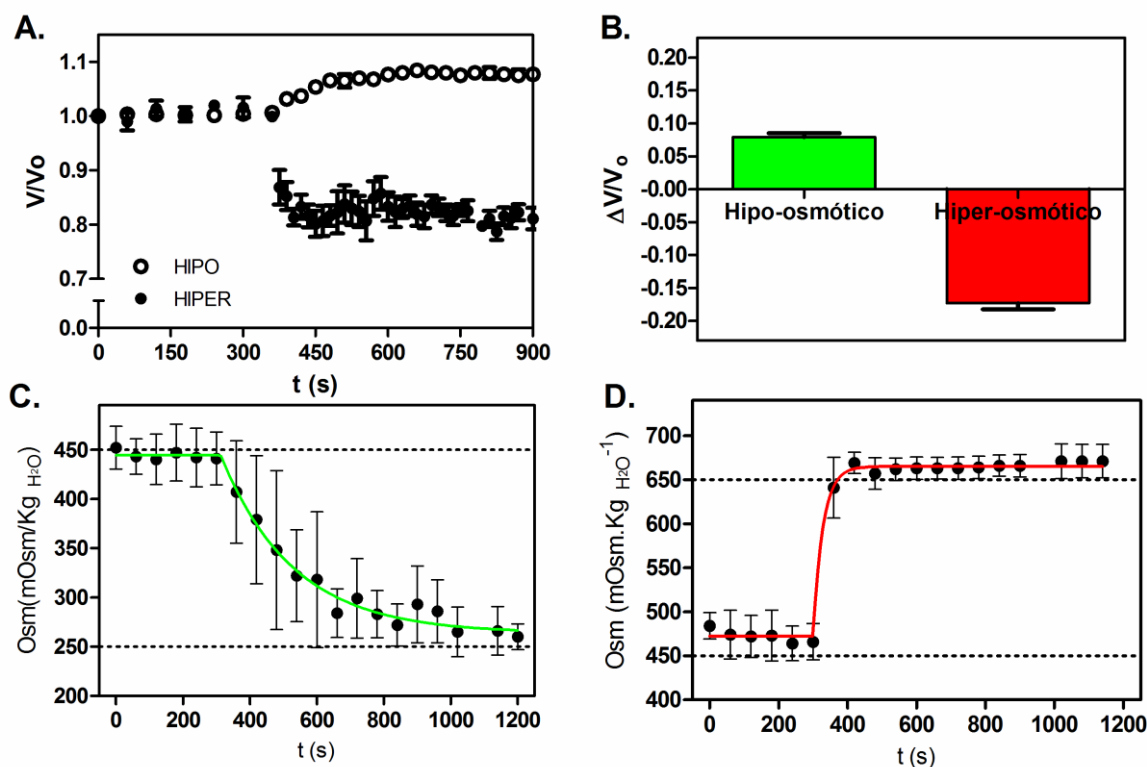


Figura 27: Caracterización del cambio de volumen en la vacuola de remolacha en condiciones hipo-osmótica e hiper-osmóticas. **A.** Volumen relativo (V/V_0) en función del tiempo (t) de la vacuola determinado durante el ensayo de perfusión en condiciones hipo-osmótico (círculo vacío) o hiper-osmóticas (círculo lleno). **B.** El cambio de volumen relativo total ($\Delta V/V_0$) alcanzado en el nuevo estado estacionario (t-test, $p < 0.0001$). **C.** Cinética de la osmolalidad externa durante la perfusión con el tratamiento HIPO. **D.** Cinética de la osmolalidad externa durante la perfusión con el tratamiento HIPER. Se representa la media \pm SEM de $n:7$ experimentos independientes.

En un sistema formado por una membrana semipermeable donde solo se mueve agua es posible estimar el cambio de volumen en la organela dado que los solutos se consideran constantes en el interior²⁶ y la variable es el cambio de osmolalidad impuesto (Ver **Tabla 8**). La magnitud del cambio alcanzado por la vacuola en el estado estacionario fue menor al esperado si el incremento o decrecimiento de volumen se debiera exclusivamente al movimiento de agua. En condiciones HIPO, el volumen relativo final del estado estacionario ascendió a 1.08 ± 0.02 , un incremento del 8%. Dado el cambio de osmolalidad se esperaba un volumen final relativo ≈ 1.68 . Asimismo, en el tratamiento HIPER se esperaba un volumen relativo final de ≈ 0.70 , en tanto el volumen relativo final fue del 0.83 ± 0.02 en los experimentos realizados.

²⁶ Dada constante la masa de solutos en el interior de la organela, es posible establecer una relación entre el volumen de la organela y la osmolalidad en el interior tal que $V_1 * C_1 = V_2 * C_2$, donde V_1 es el volumen de la organela en el estado que denominamos 1 con osmolalidad interna C_1 . En un estado 2 se cumplirá la proporción en tanto solo haya movimiento de agua. Estimamos C_1 y C_2 a partir de la concentración del medio extracelular (C_e) para el tiempo t_1 y t_2 correspondientes a estos estados sea que la organela se halla en estado estacionario.

Estos resultados indican además que las estrategias asociadas al cambio de volumen no fueron simétricas. Las diferencias observadas en cuanto a los volúmenes finales alcanzados en el nuevo estado estacionario darían cuenta también de las distintas características cinéticas del cambio de osmolalidad de los tratamientos. Por lo tanto, se incorporó en los modelos propuestos la ecuación que describe la cinética de cambios de osmolalidad del medio externo.

Tabla 2: Cinética de la osmolalidad en los ensayos de perfusión. Se presentan los parámetros de ajuste obtenidos para una función exponencial simple: $C_e(t) = (C_i - C_e') * e^{-tK} + C_e'$, donde C_e , osmolalidad externa del medio a un dado tiempo "t"; C_i , osmolalidad del medio ISO antes de iniciar el cambio de solución; C_e' , osmolalidad del medio externo en el nuevo estado estacionario cuando se logra la estabilización; K, la constante de tiempo asociada a la función exponencial. Se muestra el valor medio \pm SEM obtenido a partir de todos los resultados individuales.

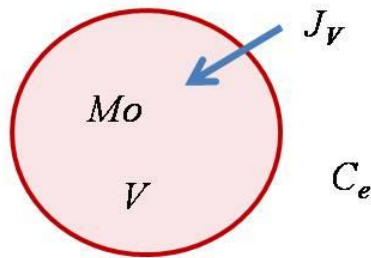
Tratamiento	Parámetros obtenidos del ajuste			
	C_i (mOsm Kg H ₂ O ⁻¹)	C_e' (mOsm Kg H ₂ O ⁻¹)	K (10 ⁻³ s ⁻¹)	R ²
HIPO	442 \pm 8	263 \pm 13	4.6 \pm 1.5	0.8273
HIPER	472 \pm 6	665 \pm 4	32 \pm 12	0.9380

2. Modelado del cambio de volumen de la vacuola en condiciones aniso-osmóticas

Se utilizó una aproximación de modelado matemático para abordar las diferencias observadas en el cambio de volumen de la vacuola de remolacha en condiciones HIPO e HIPER. Se diseñaron diferentes modelos donde se incluyó la cinética de osmolalidad en función del tiempo y posibles variables experimentales que pudieran explicar la respuesta observada. Se ajustaron cinco modelos de diferente complejidad que describen la dinámica del cambio de volumen de la vacuola y definen un coeficiente de permeabilidad osmótica al agua del tonoplasto (P_f) de acuerdo con las hipótesis subyacentes acerca del mecanismo asociado a la dinámica de cambio de volumen. Las principales características de las rutinas de modelado se indican en **Figura 28** para el tratamiento HIPO, y en la **Figura 29** para el tratamiento HIPER. Los resultados provenientes de los tratamientos HIPO han sido analizados usando cinco modelos diferentes, en tanto solo cuatro modelos fueron propuestos para el tratamiento HIPER²⁷. A continuación, se describen los modelos propuestos para el tratamiento HIPO.

²⁷ Al finalizar esta sección se especifican las causas por las que se desarrolló un modelo menos para explorar el cambio de volumen en condiciones hiper-osmóticas.

I. Modelo de Agua



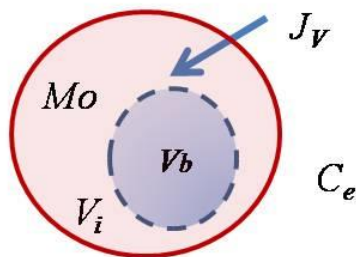
La velocidad de cambio del volumen vacuolar sólo se ve afectada por el flujo osmótico de agua.

parámetros

P_f

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\frac{M_0}{V(t)} - C_e(t) \right)$$

II. Modelo de Agua y Volumen no osmótico



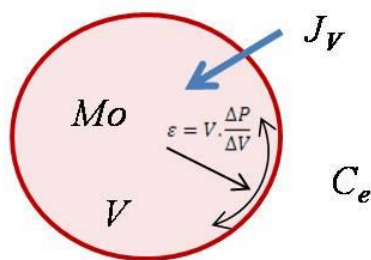
Sólo una fracción del volumen vacuolar es osmóticamente activa. La velocidad de cambio del volumen vacuolar osmóticamente activo sólo se ve afectada por el flujo osmótico de agua

parámetros

P_f y V_b

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\frac{M_0}{V(t) - V_b} - C_e(t) \right)$$

III. Modelo de Agua y Tensión elástica de la membrana



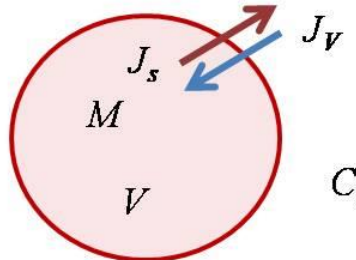
El movimiento de agua a través de la membrana imprime una modificación de la presión hidrostática. El cambio de volumen vacuolar es producto de un efecto combinado entre el flujo osmótico y la tensión mecánica que media la tensión elástica (ϵ) del tonoplasto.

parámetros

P_f y ϵ

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\left(\frac{M_0}{V(t)} - C_e \right) - \left(\frac{\epsilon * (V(t) - V_0(t))}{V(t) * RT} \right) \right)$$

IV. Modelo de Agua y Solutos



La velocidad de cambio del volumen vacuolar se ve afectada por el flujo osmótico de agua y el movimiento pasivo de solutos.

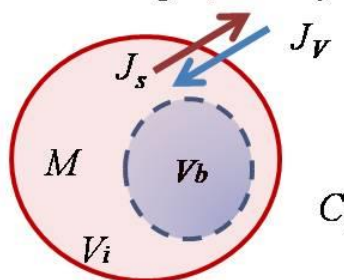
parámetros

P_f y P_s

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\frac{M(t)}{V(t)} - C_e(t) \right)$$

$$J_s(t) = -A * P_s * \left(\frac{M(t)}{V(t)} - C_e(t) \right)$$

V. Modelo de Agua, Solutos y Volumen no osmótico



La velocidad de cambio del volumen vacuolar osmóticamente activo se ve afectada por el flujo de agua y el movimiento pasivo de solutos.

parámetros

P_f , P_s y V_b

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\frac{M(t)}{V(t) - V_b} - C_e(t) \right)$$

$$J_s(t) = -A * P_s * \left(\frac{M(t)}{V(t) - V_b} - C_e(t) \right)$$

Figura 28: Modelos propuestos para analizar la dinámica de cambio de volumen de la vacuola de remolacha en condiciones hipo-osmóticas. Ante la disminución en la osmolalidad externa (C_e), las vacuolas de remolacha experimentaron un incremento de volumen a lo largo del tiempo a expensas del ingreso de flujo osmótico de agua (J_v). Se propusieron cinco modelos basados en los formalismos de Kedem- Katchalski (1958) con el objetivo de analizar los posibles mecanismos involucrados en la velocidad del cambio de volumen observado. **I.** En el Modelo de Agua (A) el cambio de volumen relativo en el tiempo se adjudica exclusivamente al flujo agua (J_v) promovido hacia el interior de la vacuola por el gradiente osmótico. **II.** En el Modelo de Agua y Volumen no Osmótico (A- V_b), sólo una fracción del volumen vacuolar (V) es osmóticamente activo (V_i). Esta fracción es la que se modifica como consecuencia del flujo osmótico de agua (J_v) hacia el interior vacuolar, manteniéndose constante el volumen no osmótico (V_b). **III.** El Modelo de Agua y Tensión elástica de la membrana (A- \mathcal{E}) supone que el cambio de volumen (ΔV) desencadena un cambio de presión hidrostática (ΔP) en el interior vacuolar. Este cambio en la presión está relacionado con el volumen a través del coeficiente elástico de la membrana (\mathcal{E}) por la expresión indicada en esta **Figura**. En este modelo, la entrada del flujo osmótico de agua (J_v) desencadena un cambio de volumen ($\Delta V/V$) asociado a la tensión que se opone a la deformación. **IV.** El Modelo de Agua y Solutos (A-S) supone que además del flujo osmótico de agua entrante (J_v) existe un flujo pasivo de solutos saliente (J_s) asociado al cambio de volumen en la vacuola. Esto determina una modificación progresiva del gradiente osmótico a través del tonoplasto en la medida que se modifica la masa de solutos interna (M) a lo largo del tiempo. **V.** En el modelo de Agua, Solutos y Volumen no osmótico (A-S- V_b) se parte de los supuestos que definen A-S y A- V_b . Se indica en cada uno de los modelos los supuestos principales asociados al modelo, las ecuaciones diferenciales que describe el flujo de agua a través de la membrana y los parámetros que caracterizan el modelo. P_f : permeabilidad osmótica de la membrana; A : área de la vacuola; V_w : volumen molar parcial del agua a la temperatura de trabajo; M_0 : la masa total de solutos al iniciar el cambio de medio; R : constante universal de los gases; T : temperatura absoluta; P_s : permeabilidad al soluto.

Descripción de los modelos propuestos para los tratamientos HIPO

1. Modelo de Agua (A)

El modelo más sencillo contempla que sólo el agua está involucrada en el cambio de volumen observado, y se lo denominó por ello Modelo de Agua. En este modelo el parámetro que caracteriza la dinámica de cambio del volumen vacuolar es el coeficiente de permeabilidad osmótica al agua (P_f) del tonoplasto, basado en la ley fenomenológica de la ósmosis.

Supuestos:

- 1) Las vacuolas se consideran esferas de un cierto volumen V y una superficie A . Existe una dependencia entre A y V , se considera que A es función del volumen y se determina a partir del volumen inicial de la vacuola (V_0), en cada paso de integración.
- 2) En la condición inicial, la vacuola -que previamente se equilibró con un compartimiento extracelular iso-osmótico sea C_0 su osmolalidad inicial- se expone entonces a una solución hipo-osmótica con osmolalidad C_e .

3) El curso temporal de C_e se determinó experimentalmente y se ajustó a la siguiente expresión exponencial a partir del cambio de medio (t: 360s):

$$C_e(t) = (C_0 - C'_e) * e^{(-t/t')} + C'_e$$

Ecuación 4

Sea $(C_0 - C'_e) = (180.2 \pm 15.9) \text{ mOsmol Kg}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$; $t' = (237.2 \pm 22.4) \text{ s}$; y $C'_e = (258.8 \pm 3.2) \text{ mOsmol Kg}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$. En el caso del parámetro t' , se liberó el valor cargando en cada rutina de ajuste el intervalo ($X \pm \text{SEM}$) que contiene a la media.

4) Se supone que el flujo se compone principalmente de agua, un supuesto que se basa implícitamente en la idea de que es una solución muy diluida. El agua se mueve a través de la tonoplasto (que incluye la bicapa lipídica y canales de agua específicos, las acuaporinas) de acuerdo con la ley fenomenológica de la ósmosis:

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\frac{M_0}{V(t)} - C_e(t) \right)$$

Ecuación 5

Donde,

J_v : el flujo osmótico a través del tonoplasto

A : el área superficial de la vacuola

P_f : el coeficiente de permeabilidad osmótica

V_w : el volumen molar parcial del agua

M_0 : el número total de moles de las especies de soluto intracelular, $M_0 = C_0 * V_0$

V : el volumen de la vacuola

C_e : la osmolalidad del medio externo a la vacuola

$M_0/V(t)$: la concentración intra-vacuolar de solutos en cada instante t'

5) La velocidad de cambio del volumen vacuolar sólo se ve afectada por el flujo osmótico de agua, se cumple el teorema de continuidad tal que,

$$\frac{dv}{dt} = J_v$$

Ecuación 6

2. Modelo de agua y Volumen no osmótico (A- V_b)

El segundo modelo contempla que una parte del volumen de la vacuola es osmóticamente inactivo. En el protoplasma tradicionalmente se asocia el volumen no

osmótico a la presencia de gránulos y organelas (Sommer *et al.*, 2007), en vacuolas la presencia de sustancias de reserva no permeables o pigmentos puede contribuir con una región osmóticamente no activa.

Entonces, este modelo describe la dinámica de cambio de volumen basado en que el movimiento de agua es responsable del cambio de volumen de solo una fracción osmóticamente activa (V_i). Por ende, dos parámetros son incluidos en este modelo, P_{uf} y el volumen no osmótico (V_v). El Modelo de Agua se modifica en el ítem 4) para ajustarlo al Modelo de Agua y Volumen no osmótico.

4') El volumen total de la vacuola es $V(t) = V_b + V_i(t)$. Por lo tanto, la ecuación 5 se modifica de acuerdo a:

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\frac{M_0}{V(t) - V_b} - C_e(t) \right)$$

Ecuación 7

3. Modelo de Agua y coeficiente elástico de la membrana (A- \mathcal{E})

En el tercer caso, se propone que el cambio de volumen promovido por el ingreso de agua es contrarrestado por una tensión a nivel de la membrana. Es decir, el movimiento de agua a través de la membrana imprime una modificación de la presión hidrostática. Aquí, el volumen de la vacuola está limitado por el efecto combinado del flujo osmótico y la tensión mecánica sobre esta membrana que está ligado al módulo de tensión elástica (\mathcal{E}) del tonoplasto.

Modificaciones sobre los supuestos del Modelo de Agua:

1'') El modelo de difusión general para el agua implica dos fuerzas motrices posibles para generar los movimientos del agua, el gradiente osmótico (ΔC) y la diferencia de presión hidrostática (ΔP)

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\Delta C - \frac{\Delta P}{RT} \right)$$

Ecuación 8

2'') Dado \mathcal{E} , el módulo elástico volumétrico, como el cambio de presión inducido por el cambio de volumen, si suponemos que esta propiedad es una constante en el sistema (Tyerman & Steudle, 1984), puede expresarse como:

$$\mathcal{E} = V \cdot \frac{\Delta P}{\Delta V}$$

Ecuación 9

3'') Expresamos la variación de presión hidrostática en función de \mathcal{E} y el cambio de volumen que experimenta el sistema por la entrada de agua. Entonces, la ecuación que describe el flujo de agua queda expresada en términos de las dos fuerzas impulsoras involucradas como:

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\Delta C - \frac{\mathcal{E} * (V(t) - V_o(t))}{V(t) * RT} \right)$$

Ecuación 10

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\left(\frac{M_0}{V(t)} - C_e \right) - \left(\frac{\mathcal{E} * (V(t) - V_o(t))}{V(t) * RT} \right) \right)$$

4. Modelo de Agua y Solutos (A-S)

En el cuarto modelo se considera que el volumen vacuolar está determinado por la combinación del efecto de flujos de agua entrante y de soluto saliente dado el gradiente hipo-osmótico. Asimismo, dos alternativas son posibles bajo esta suposición. La primera de ellas es que todo el volumen de la vacuola es plausible de ser cambiado; o que sólo una fracción del volumen total de la organela es plausible de ser cambiado. En ambos casos P_s se refiere a una permeabilidad de solutos genérica que incluye todos los posibles solutos que intervienen en los procesos de transporte a través de la tonoplasto.

Incorporación de supuestos al Modelo de agua para definir el Modelo de agua y de solutos.

4''') El soluto puede ser transportado a través de la membrana por difusión simple:

$$J_s(t) = -A * P_s * \left(\frac{M(t)}{V(t)} - C_e(t) \right)$$

Ecuación 11

Donde,

J_s : el flujo de soluto a través de la membrana

P_s : la permeabilidad de solutos de esta membrana

El símbolo menos indica la dirección opuesta para el flujo de soluto en comparación con el flujo de agua

5'') La velocidad de cambio de solutos intra-vacuolares depende del transporte a través del tonoplasto

$$\frac{dM}{dt} = J_s$$

Ecuación 12

6'') Se considera despreciable la interacción que pudiese existir entre el potencial eléctrico de la membrana tanto con el volumen de la vacuola como con el flujo de soluto a través del tonoplasto. El agente osmótico es un soluto no cargado y el medio en el que se aislaron las vacuolas carece de iones por lo que se espera que no existan cambios en el potencial de membrana. Dada la elevada permeabilidad que presenta el tonoplasto al K^+ , y el número de bombas de protones (Neuhaus & Trentmann, 2014), se puede suponer que en este sistema después del protocolo de extracción: a) la vacuola presenta sumamente reducido el contenido de K^+ ; b) el potencial de membrana quedaría cercano a cero o a un potencial Donnan; c) el modelo propuesto para predecir el valor de potencial de membrana a partir de la ecuación de Goldman no se puede aplicar adecuadamente dada la abundante presencia de la bombas de protones en el tonoplasto.

7'') Entonces el cambio de volumen estaría ligado a dos ecuaciones diferenciales, una que describe el flujo de agua entrante (Ecuación 13) y una que describe el flujo de soluto saliente (Ecuación 11).

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\frac{M(t)}{V(t)} - C_e(t) \right)$$

Ecuación 13

8'') Este modelo no tiene en cuenta las interacciones entre el agua y solutos; ni si las vías son compartidas o no. P_f y P_s son los dos parámetros libres del modelo.

5. Modelo de Agua, Solutos y Volumen no osmótico (A-S-V_b)

En el caso de contemplar el volumen no osmótico estas ecuaciones diferenciales se modifican en cuanto a la expresión del volumen total, siendo:

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(\frac{M(t)}{V(t) - V_b} - C_e(t) \right)$$

Ecuación 14

$$J_s(t) = -A * P_s * \left(\frac{M(t)}{V(t) - V_b} - C_e(t) \right)$$

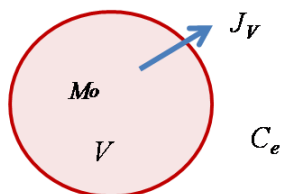
Ecuación 15

Descripción de los modelos propuestos para los tratamientos HIPER

A partir de los mismos supuestos descritos en las condiciones HIPO se desarrollaron cuatro modelos diferentes para analizar el cambio de volumen en condiciones HIPER (**Figura 29**). Dado el incremento de la masa de manitol en el medio externo, el gradiente de osmolalidad favorece la salida de agua desde el interior de la vacuola. En la **Figura 29**, se pueden observar las principales ecuaciones diferenciales que caracterizan cada uno de los modelos propuestos. No se propuso un modelo que incluya el coeficiente elástico (\mathcal{E}) de la membrana en condiciones HIPER. La reducción del volumen de la vacuola a expensas de la salida de agua no determina un incremento apreciable en la presión hidrostática. Por lo tanto, este término sería despreciable dadas las características de la curva presión–volumen descritas en los sistemas celulares. En este sentido para diferentes sistemas existen reportes donde las organelas y/o células reducen su volumen y experimentan fenómenos de fragmentación acoplados (Giles *et al.*, 1976; Diekmann *et al.*, 1993; Reisen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014). En los mencionados estudios la fragmentación se produce cuando la organela se encuentra en el interior celular y no aislada como es en nuestro caso. En los experimentos de perfusión realizados no se detectó gemación o fragmentación de la vacuola.

El diseño de los modelos contempló nuevamente que el volumen final del estado estacionario no es el esperado para la salida exclusiva de agua, en este caso el estado estacionario presenta un volumen mayor al esperado. En todos los casos se incorporó al modelo la cinética de cambio de osmolalidad en función del tiempo presentada en la **Tabla 2**.

I. Modelo de Agua



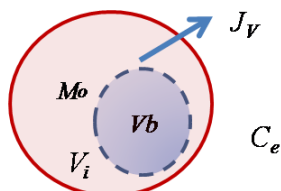
La velocidad de cambio del volumen vacuolar sólo se ve afectada por el flujo osmótico de agua

parámetros

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(C_e(t) - \frac{M_o}{V(t)} \right)$$

P_f

II. Modelo de Agua y Volumen no osmótico



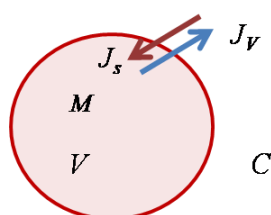
Sólo una fracción del volumen vacuolar es osmóticamente activa. La velocidad de cambio del volumen vacuolar osmóticamente activo sólo se ve afectada por el flujo osmótico de agua

parámetros

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(C_e(t) - \frac{M_o}{V(t) - V_b} \right)$$

P_f y V_b

III. Modelo de Agua y Solutos



La velocidad de cambio del volumen vacuolar se ve afectada por el flujo osmótico de agua y el movimiento pasivo de solutos.

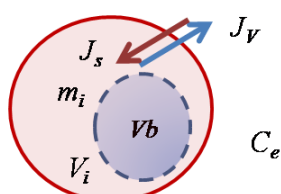
parámetros

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(C_e(t) - \frac{M(t)}{V(t)} \right)$$

P_f y P_s

$$J_s(t) = -A * P_s * \left(C_e(t) - \frac{M(t)}{V(t)} \right)$$

IV. Modelo de Agua, Solutos y Volumen no osmótico



La velocidad de cambio del volumen vacuolar osmóticamente activo se ve afectada por el flujo de agua y el movimiento pasivo de solutos.

parámetros

$$J_v(t) = A * P_f * V_w * \left(C_e(t) - \frac{M(t)}{V(t) - V_b} \right)$$

P_f, P_s y V_b

$$J_s(t) = -A * P_s * \left(C_e(t) - \frac{M(t)}{V(t) - V_b} \right)$$

Figura 29: Modelos propuestos para analizar la dinámica de cambio de volumen de la vacuola de remolacha en condiciones hiper-osmóticas. Ante el incremento de la osmolalidad externa (C_e), las vacuolas de remolacha experimentaron un decrecimiento en su volumen a lo largo del tiempo a expensas de la salida de un flujo osmótico de agua (J_v). Se propusieron cuatro modelos basados en los formalismos de Kedem- Katchalski (1958) con el objetivo de analizar los posibles mecanismos involucrados en la velocidad del cambio de volumen observado. **I.** En el Modelo de Agua (A) el cambio de volumen relativo en el tiempo se adjudica exclusivamente al flujo agua (J_v) promovido hacia el exterior de la vacuola por el gradiente osmótico. **II.** En el Modelo de Agua y Volumen no Osmótico (A- V_b), sólo una fracción del volumen vacuolar (V) es osmóticamente activo (V_i). Esta fracción es la que se modifica como consecuencia de la salida de flujo osmótico de agua (J_v), sin modificaciones del volumen no osmótico (V_b). **III.** El Modelo de Agua y Solutos (A-S) supone que además del flujo osmótico de agua saliente (J_v) existe un flujo pasivo de solutos entrante (J_s) asociado al cambio de volumen en la vacuola. Esto determina una modificación progresiva del gradiente osmótico entre el medio y el interior de la vacuola a medida que se modifica la masa de solutos interna (M) a lo largo del tiempo. **IV.** En el modelo de Agua, Solutos y Volumen no osmótico (A-S- V_b) se parte de los supuestos que definen A-S y A- V_b . Se indica en cada uno de los modelos los supuestos principales asociados al modelo, las ecuaciones diferenciales que describen el flujo de agua a través de la membrana y los parámetros que caracterizan el modelo. P_f : permeabilidad osmótica de la membrana; A : área de la vacuola; V_w : volumen molar parcial del agua a la temperatura de trabajo; M_o : la masa total de solutos al iniciar el cambio de medio; P_s : permeabilidad al soluto.

3. Evaluación de los modelos a partir del ajuste a los resultados experimentales en condiciones HIPO

Se inició el ajuste de los modelos a partir de los resultados experimentales obtenidos en los ensayos de perfusión (círculos negros, **Figura 30**). Se realizaron las simulaciones basadas en los modelos descritos a fin de obtener los parámetros que caracterizan cada uno de los mismos.

En la rutina de ajuste se consideró $V(t=0): V_0$, $M(t=0): M_0$, siendo V_0 determinado experimentalmente por video-microscopía, y M_0 calculado a partir de V_0 y la osmolalidad inicial (C_0) de la solución en que fueron equilibradas las vacuolas ($M_0 = V_0 * C_0$). Cada uno de estos ajustes se obtuvo explorando un amplio rango de valores posibles para los parámetros que caracterizan a cada modelo hasta encontrar aquella combinatoria que minimizara las diferencias entre la curva simulada y los valores experimentales.

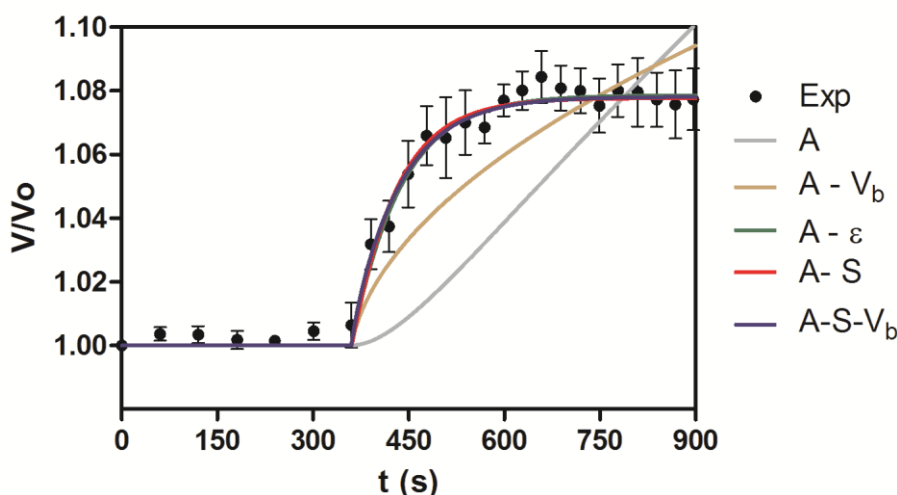


Figura 30: Cambio de volumen de las vacuolas en función del tiempo a pH 7.6 en condiciones HIPO y ajustes obtenidos con los diferentes modelos planteados. Los modelos propuestos se ajustaron a los datos experimentales (Exp; círculos negros). Las líneas continuas representan el mejor ajuste obtenido con cada modelo a partir de los resultados experimentales. A: Modelo de Agua; A- V_b : Modelo de Agua Volumen no osmótico; A- ϵ : Modelo de Agua y coeficiente elástico de la membrana; A-S: Modelo de Agua y Solutos; A-S- V_b : modelo de agua, solutos y volumen no osmótico. Los resultados experimentales representan la media \pm SEM de n: 3 experimentos independientes, con 4-5 réplicas biológicas en cada uno.

En la **Figura 30** se presenta el mejor ajuste obtenido a partir de los resultados experimentales, para los cinco modelos propuestos. Es posible observar en la **Figura 30** que tres de los cinco modelos probados (Modelo de A- ϵ ; A-S; A-S- V_b) arrojaron curvas simuladas que se superponen muy bien a los resultados experimentales obtenidos en esta condición. En otras palabras, estos modelos reprodujeron la respuesta experimental del sistema. En cambio, los Modelos de Agua (A) y de Agua

y Volumen no osmótico ($A-V_b$), arrojaron curvas que difieren sustancialmente de los valores experimentales medidos para la vacuola en el sistema de perfusión (curva gris y curva marrón, **Figura 30**). En ambos casos no reprodujeron la respuesta observada en los ensayos de perfusión.

Los valores obtenidos para los parámetros característicos de cada modelo se presentan en la **Tabla 3**. Allí puede observarse que el mejor ajuste del Modelo **A** y **A- V_b** se logra cuando la P_f resulta extremadamente pequeña e incluso en esa condición no es posible reproducir el cambio de volumen observado. Estos resultados son compatibles con los reportes previos realizados por nuestro grupo de investigación (Amodeo *et al.*, 2002), donde se ha discutido que el pequeño cambio de volumen relativo de las vacuolas de la raíz almacenadora de *Beta vulgaris* no podía explicarse en términos de movimiento de agua exclusivamente.

Tabla 3: Parámetros obtenidos del mejor ajuste de cada uno de los modelos a partir de los resultados experimentales a pH: 7.6, en condiciones HIPO. Se presentan los parámetros del mejor ajuste obtenido en cada modelo para la media de las réplicas biológicas. De acuerdo al criterio de Akaike, el modelo con menor AIC es el más apropiado para reproducir el comportamiento observado. El cálculo contempla la bondad de ajuste, el número de parámetros del modelo (K) y el número de valores experimentales disponibles para realizar el ajuste (N). En las simulaciones la bondad de ajuste se estimó a partir de R, la suma promedio de residuos entre los resultados del ajuste y los valores experimentales. Por lo tanto, un menor valor de R indica que es menor la diferencia entre el valor simulado y el experimental. AIC: criterio de Akaike (1974) para comparar los modelos. Las siglas de los modelos y parámetros se corresponden con las detalladas en el texto.

Modelo	A	A - V_b	A - ε	A - S	A - S- V_b
P_f (cm.s ⁻¹)	5.7×10^{-5}	9.8×10^{-7}	9.8×10^{-2}	1.7×10^{-2}	0.14×10^{-2}
P_s (cm.s ⁻¹)	-	-	-	6.3×10^{-4}	0.60×10^{-4}
V_b	-	0.99	-	-	0.10
ε (MPa)	-	-	4.95	-	-
R x10 ⁴	7.61	2.02	0.138	0.136	0.139
K	1	2	2	2	3
N	27	27	27	27	27
AIC	-191.74	-225.21	-297.62	-297.97	-294.85

Dado el ajuste obtenido con el A-V_b, aún cuando la vacuola tuviera un 99% de su volumen osmóticamente inactivo y una bajísima P_f no reprodujo la respuesta caracterizada experimentalmente. Por lo tanto, el A y el A-V_b fueron descartados.

A partir del criterio de Akaike (1974) se eligió el Modelo de A-S como el que mejor reproduce la respuesta osmótica de las vacuolas de remolacha (**Tabla 3**) comparado con los otros dos modelos. A partir de las rutinas algebraicas el Modelo de A- \mathcal{E} presentó valores para el \mathcal{E} (≈ 5 MPa, **Tabla 3**) compatibles con lo reportado en la bibliografía para la pared celular de las hojas, 1-50 MPa (Penuelas *et al.*, 1996; Nobel, 2009) **Tabla 8**. De acuerdo con el valor obtenido un cambio en una unidad del volumen relativo de la vacuola promueve un incremento de la presión de 5 MPa. Los reportes en protoplastos, muestran que ante cambios de osmolalidad del medio cuando en el interior la presión asciende a 20 mm de Hg (≈ 0.003 MPa) la membrana se rompe (Wolfe *et al.*, 1986; Peyronnet *et al.*, 2014). En este contexto, los valores obtenidos de P_f fueron elevados (≈ 0.1 cm s⁻¹) respecto de los reportes presentes en la bibliografía para vacuolas. En conjunto, si bien el modelo reproduce el comportamiento observado en la vacuola de remolacha, los resultados no pueden considerarse fisiológicamente factibles.

El modelo denominado de Agua y Solutos (A-S) es el que mejor reproduce el comportamiento de las vacuolas de *Beta vulgaris* sometidas a un gradiente hipo-osmótico. Los parámetros obtenidos de este modelo proporcionan un flujo de masa de solutos a través de la membrana ligado directamente al coeficiente de permeabilidad de solutos (P_s) que se combina con los valores de permeabilidad osmótica obtenida (P_f). Los resultados del ajuste a este modelo presentaron valores de P_f compatibles con los reportados en bibliografía para sistemas semejantes.

4. Validación del modelo en otras condiciones

4.1. Modelado del cambio de volumen de la vacuola en condiciones hiper-osmóticas

A partir de los mismos supuestos establecidos en las condiciones HIPO se propusieron cuatro modelos (**Figura 28**) que pudieran dar cuenta del cambio de volumen presentado en la **Figura 27 A** para la condición HIPER. En todos los casos se incorporó al modelo la cinética de cambio de osmolalidad en función del tiempo presentada en la **Tabla 2**. En la **Figura 31** se presenta el mejor ajuste obtenido para cada uno de los modelos provenientes de las rutinas dependiente de los resultados experimentales medidos en condiciones HIPER (Exp, círculos negros), como se realizó para los ensayos HIPO. El Modelo de Agua (A) y el Modelo de Agua y volumen

no osmótico ($A-V_b$) no reproducen apropiadamente el cambio de volumen que experimentó la vacuola de remolacha en condiciones HIPER. La curva que corresponde al Modelo de Agua y Solutos ($A-S$) es la que mejor se ajusta a los resultados experimentales determinados durante los experimentos de perfusión.

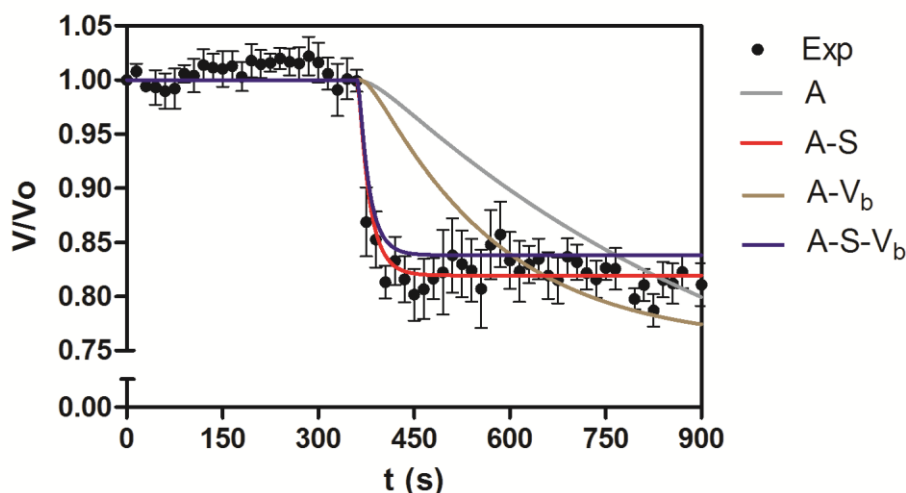


Figura 31 : Cambio de volumen de las vacuolas en función del tiempo a pH: 7.6 en condiciones HIPER. Los modelos propuestos se ajustaron a los datos experimentales (Exp; círculos negros). Las líneas continuas representan el mejor ajuste obtenido con cada modelo a partir de los resultados experimentales. A: Modelo de Agua; $A-V_b$: Modelo de Agua Volumen no osmótico; A-S: Modelo de Agua y Solutos; $A-S-V_b$: Modelo de agua, solutos y volumen no osmótico. Los resultados experimentales representan la media \pm SEM de n:3 experimentos independientes, con 2-3 réplicas biológicas en cada uno.

En la **Tabla 4** se presentan los valores obtenidos para los parámetros en el mejor ajuste (mínimo R) de cada uno de los modelos. Dado que el volumen final de estado estacionario es superior al esperado, se observa que el M-A y el M-A- V_b forzaron el ajuste con valores de P_f relativamente bajos respecto a los reportados en la bibliografía, aunque no fue suficiente para reproducir el comportamiento experimental (**Figura 31**). Tanto el Modelo de A-S como el modelo de $A-S-V_b$, presentaron resultados acordes con lo reportado para la bibliografía en cuanto a la P_f . Se aplicó el criterio de Akaike para seleccionar el modelo más apropiado que reproduzca la situación experimental. Por lo tanto, en las condiciones HIPER, el modelo de agua y solutos es el que mejor ajusta a los resultados experimentales obtenidos en los ensayos de perfusión presentando el AIC más pequeño.

Tabla 4: Parámetros obtenidos del ajuste para cada uno de los modelos a partir de los resultados experimentales a pH: 7.6 en el tratamiento hiper-osmótico. Se presentan los parámetros del mejor ajuste obtenido en cada modelo para el promedio de las réplicas biológicas. R, suma promedio de residuos del resultado del ajuste respecto a los valores experimentales; k: es el número de parámetros del modelo; n: es el número de puntos experimentales; AIC: criterio de Akaike para comparar los modelos. Las siglas de los modelos corresponden con las detalladas en el texto, así como los parámetros.

Modelo	A	A - V _b	A - S	A - S - V _b
P_f (cm.s ⁻¹)	2.0×10^{-4}	2.9×10^{-4}	9.4×10^{-3}	1.0×10^{-2}
P_s (cm.s ⁻¹)	-	-	1.1×10^{-4}	1.0×10^{-4}
V _b	-	0.07	-	0.01
R	0.0037	0.0027	0.00021	0.00039
K	1	2	2	3
N	26	26	26	26
AIC	-143	-149	-216	-197

El Modelo de Agua y Solutos (A-S) desarrollado es por lo tanto el que mejor reprodujo el comportamiento de las vacuolas de remolacha en condiciones aniso-osmóticas (HIPO e HIPER) a pH 7.6.

4.2. Modelado del cambio de volumen de la vacuola en condiciones hipo-osmóticas donde se ve afectado el movimiento de agua por la modulación mediada por pH

La modificación del pH en el citosol forma parte del mecanismo modulador de la permeabilidad al agua de las membranas en la raíz almacenadora de *Beta vulgaris* (Amodeo *et al.*, 2002; Alleva *et al.*, 2006). Se ha demostrado que especialmente la acidificación citosólica modula negativamente la permeabilidad al agua de las membranas biológicas que expresan acuaporinas tanto en membrana plasmática (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Alleva *et al.*, 2006; Bellati *et al.*, 2010) como en tonoplasto (Sutka *et al.*, 2005). En condiciones HIPO, se realizaron ensayos de perfusión modificando el pH extravacuolar (pH: 8.8; 7.6, 7.0, 6.8 y 6.6) para evaluar la pertinencia del modelo elegido (Modelo de Agua y Solutos) y la dinámica de la permeabilidad osmótica asociada al cambio de volumen. En la **Figura 32 A**, se presentan los datos expresados como promedios del cambio de volumen en función del tiempo medido en las cinco condiciones de pH propuestas. Al acidificarse el medio extra-vacuolar el volumen final del estado estacionario disminuye (Amodeo *et al.*, 2002; Sutka *et al.*, 2005).

Se procedió a realizar el ajuste de los cinco modelos para el tratamiento HIPO. En la **Tabla 5** se presenta el resultado obtenido del mejor ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales en cada condición de pH probada.

En la **Tabla 5** puede observarse que, como resultado del análisis de los coeficientes, en todos los casos el modelo de Agua y el coeficiente elástico de la membrana (A- ϵ) presentan un ajuste tan bueno como el Modelo de Agua y Solutos (A-S) y el Modelo de Agua, Solutos y Volumen no osmótico (A-S- V_b). En las condiciones de pH probadas, los valores de permeabilidad osmótica (P_f) obtenidos del ajuste del Modelo A- ϵ no mostraron sensibilidad a pH y resultaron elevados ($\approx 0.1 \text{ cm s}^{-1}$) si se los compara con la bibliografía ($< 0.07 \text{ cm s}^{-1}$, (Maurel *et al.*, 1997; Morillon & Lasalles, 1999). Asimismo, los valores obtenidos para el coeficiente elástico de la membrana si bien son compatibles con los reportes disponibles para la pared celular (1-50 MPa, (Penuelas *et al.*, 1996; Nobel, 2009), resultaron biológicamente inconsistentes de acuerdo a los reportes de la bibliografía para protoplastos aislados (Wolfe *et al.*, 1986; Peyronnet *et al.*, 2014). Por lo tanto, este modelo se descartó.

En todos los casos la condición de pH 6.6 constituyó una condición extrema donde las vacuolas de remolacha no presentan un cambio de volumen distinguible a pesar de la imposición de un cambio de osmolalidad del medio. Los resultados de ajuste obtenidos a pH 6.6 no presentan una marcada diferencia entre los modelos al comparar el AIC (**Tabla 5**). En este caso, en todos los modelos la rutina de ajuste forzó los parámetros para minimizar el cambio de volumen. De acuerdo con los parámetros que definen cada uno de los modelos lo que se obtuvo es la combinación numérica que determina la mínima variación de volumen posible teniendo en cuenta la cinética de osmolalidad en función del tiempo medida. Por lo tanto, la interpretación de estos parámetros queda limitada por los rangos de valores que se ajustaron y el mínimo encontrado. Por ejemplo, en el caso del Modelo de A donde solo un parámetro fue ajustado, se obtiene el mínimo valor dentro del rango fisiológico reportado y ensayado. En tanto la resolución de las ecuaciones diferenciales, matemáticamente podría haberse hallado un valor numérico tal que el cambio de volumen fuera igual a cero. Este procedimiento no sería compatible con el sistema en estudio. La presencia de la bicapa lipídica determina que puede existir pasaje de agua, no hay reportes que indiquen que su permeabilidad sea dependiente del pH hasta la actualidad.

A partir del criterio de AIC se analizó la pertinencia del Modelo según cada condición de pH. Nuevamente los Modelos de Agua (A) y Agua y Volumen no osmótico (A- V_b) presentaron los AIC de mayor valor (**Tabla 6**). Por lo tanto, en todas las condiciones de pH probadas se verificó que el Modelo de Agua (A) fue el menos apropiado para describir el cambio de volumen en función del tiempo de la vacuola. Así como se

mencionó anteriormente a pH 7.6, en los restantes pH los valores de P_f provenientes del ajuste resultan sumamente bajos respecto a los reportes de la bibliografía. Las rutinas de ajuste para el modelo de Agua y Volumen no osmótico tampoco dieron cuenta de los cambios de volumen medidos exitosamente. Los resultados obtenidos en esta rutina sugirieron que en todas las condiciones de pH la fracción de volumen osmóticamente inactivo de la vacuola es del 99% con una baja permeabilidad osmótica asociada al tonoplasto ($P_f < 1.2 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$).

El Modelo de Agua y Solutos presentó un buen ajuste a los resultados experimentales de los cinco modelos probados en todos los pH, tanto en cuanto al valor del AIC como en relación al rango de valores obtenidos para P_f . En la **Tabla 6** y **Tabla 5** se presentan los valores obtenidos para los parámetros del modelo en las cinco condiciones de pH. En la **Figura 32** se presentan las simulaciones de volumen relativo en función de tiempo obtenidas del mejor ajuste del modelo en cada condición. La inclusión del volumen no osmótico como parámetro del modelo (Modelo de Agua, Solutos y Volumen no osmótico, A-S- V_b) fue descartada, aunque presentó AIC inferiores a los del Modelo A-S. Los resultados de ajuste para los coeficientes de permeabilidad resultaron inferiores a los reportados por la bibliografía y el V_b en los rangos de pH caracterizado presentó gran variabilidad. Si bien, el ajuste de ambos modelos presenta semejante capacidad, se consideró al Modelo de A-S como el más apropiado, al estar definido por menos parámetros (principio de parsimonia).

Tabla 5: Resultados obtenidos del ajuste de los modelos a partir de los resultados experimentales en condiciones HIPO en cinco condiciones de pH. Las medidas experimentales de volumen relativo en función del tiempo en cinco condiciones de pH fueron utilizadas para realizar el ajuste de los Modelos propuestos. Se presentan los parámetros obtenidos del mejor ajuste realizado a partir de la media de los resultados experimentales en cada condición de pH probada. La bondad del ajuste se estimó a partir de R, la suma promedio de residuos entre el resultado de la simulación proveniente del ajuste y los valores experimentales. A menor R, los valores provenientes de la simulación son más parecidos a los resultados experimentales; AIC: criterio de Akaike (1974) para comparar los modelos. Las siglas de los modelos corresponden con las detalladas en Resultados, asimismo en el caso de los parámetros.

pH	Parámetros	A	A – ϵ	A - V_b	A-S	A-S- V_b
8.6	$P_f(\text{cm.s}^{-1})$	6.6×10^{-5}	9.9×10^{-2}	1.2×10^{-6}	2.0×10^{-2}	4.3×10^{-4}
	$P_s(\text{cm.s}^{-1})$	-	-	-	6.4×10^{-4}	1.9×10^{-5}
	V_b	-	-	0.99	-	0.23
	ϵ (MPa)	-	4.32	-	-	-
	$R \times 10^4$	9.57	0.177	2.57	0.169	0.187
	AIC	-185.54	-292.10	-218.68	-292.18	-286.81
7.6	$P_f(\text{cm.s}^{-1})$	5.7×10^{-5}	9.8×10^{-2}	9.8×10^{-7}	1.4×10^{-2}	1.4×10^{-3}
	$P_s(\text{cm.s}^{-1})$	-	-	-	5.1×10^{-4}	6.0×10^{-4}
	V_b	-	-	0.99	-	0.10
	ϵ (MPa)	-	4.95	-	-	-
	$R \times 10^4$	7.61	0.138	2.02	0.136	0.139
	AIC	-191.74	-297.62	-225.21	-297.97	-294.85
7.0	$P_f(\text{cm.s}^{-1})$	3.0×10^{-5}	9.9×10^{-2}	3.5×10^{-7}	3.2×10^{-2}	1.2×10^{-6}
	$P_s(\text{cm.s}^{-1})$	-	-	-	2.3×10^{-3}	2.1×10^{-6}
	V_b	-	-	0.99	-	0.91
	ϵ (MPa)	-	9.60	-	-	-
	$R \times 10^4$	2.94	0.135	1.08	0.854	0.0531
	AIC	-209.27	-287.84	-242.06	-310.60	-320.89
6.8	$P_f(\text{cm.s}^{-1})$	1.7×10^{-5}	9.9×10^{-2}	1.5×10^{-7}	7.8×10^{-3}	1.2×10^{-5}
	$P_s(\text{cm.s}^{-1})$	-	-	-	9.6×10^{-4}	3.5×10^{-6}
	V_b	-	-	0.99	-	0.84
	ϵ (MPa)	-	16.6	-	-	-
	$R \times 10^4$	1.07	0.060	0.40	0.054	0.031
	AIC	-244.80	-321.23	-267.59	-322.86	-335.67
6.6	$P_f(\text{cm.s}^{-1})$	9.8×10^{-7}	1.0×10^{-5}	9.5×10^{-7}	1.1×10^{-3}	1.5×10^{-6}
	$P_s(\text{cm.s}^{-1})$	-	-	-	2.0×10^{-3}	2.7×10^{-6}
	V_b	-	-	0.51	-	0.1
	ϵ (MPa)	-	1.00×10^9	-	-	-
	$R \times 10^4$	0.0398	0.0398	0.0398	0.0398	0.0404
	AIC	-333.55	-331.41	-331.20	-331.24	-328.27

Los parámetros obtenidos del ajuste del Modelo de A-S presentaron un volumen relativo final diferente para cada condición de pH, y la tasa inicial de cambio de volumen relativo diferente para cada condición de pH (**Tabla 6**). El perfil de respuesta de la P_f en relación con los distintos pH probados fue concordante con los resultados publicados previamente para vesículas de tonoplasto de remolacha (Sutka *et al.*, 2005). En ambas metodologías se observó que P_f se comporta en forma no monotónica respecto al pH del medio. A pH 6.8 y 7.6 se obtuvieron valores de permeabilidad iguales entre sí y mínimos²⁸ (**Tabla 6**) que se contraponen a los valores de permeabilidad obtenida del ajuste a pH 7.0 y 8.6 donde se presentaron dos máximos locales equivalente entre sí. Por otro lado, P_s resultó afectada por el pH, reduciéndose significativamente a pH 7.6 y a pH 8.6.

Tabla 6: Resultados obtenidos para los parámetros del ajuste del Modelo de A-S en todos los experimentos realizados. Los coeficientes de permeabilidad osmótica (P_f) y permeabilidad de solutos (P_s) se representan como la media \pm SEM de un total de “n” experimentos realizados en cada condición de pH. Se presenta la relación P_f/P_s que caracteriza al modelo y el volumen relativo el estado estacionario (V_f/V_o) obtenido de las simulaciones para cada condición de pH probada. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores del parámetro en los distintos pH ($p < 0.05$, Mann-Whitney test).

pH	$P_f \times 10^3$ (cm s ⁻¹)	$P_s \times 10^3$ (cm s ⁻¹)	P_f/P_s	V_f/V_o	n
8.6	21 \pm 5 ^b	0.77 \pm 0.10 ^d	33.85 \pm 5.69 ^g	1.085 \pm 0.012 ^k	6
7.6	9 \pm 2 ^a	0.35 \pm 0.07 ^e	27.68 \pm 2.62 ^g	1.073 \pm 0.008 ^k	14
7.0	27 \pm 5 ^b	2.1 \pm 0.4 ^f	14.04 \pm 0.91 ^h	1.040 \pm 0.004 ^L	14
6.8	7 \pm 3 ^a	1.4 \pm 0.9 ^f	8.19 \pm 1.22 ⁱ	1.023 \pm 0.004 ^m	10
6.6	0.4 \pm 0.3 ^c	2.0 \pm 1.6 ^f	1.12 \pm 0.44 ^j	1.002 \pm 0.002 ⁿ	6

De acuerdo con lo que predicen las ecuaciones que determinan el modelo de A-S, el volumen relativo del estado estacionario depende de la permeabilidad al agua y a solutos del sistema. Los valores obtenidos de cada uno de los ajustes individuales a los experimentos independientes fueron analizados en conjunto a partir del coeficiente P_f/P_s . En la **Figura 32 C**, se representa este coeficiente en función del pH. Se observó que la relación entre parámetros que definen el modelo tiene una dependencia con el pH, en el rango ensayado, de tipo exponencial simple decreciente donde definimos la siguiente función:

²⁸ Los valores obtenidos a pH 6.6 no se analizan en este aspecto dado los argumentos de ajustes ya mencionados en esta sección.

$$\frac{P_f}{P_s} = W * e^{\left(\frac{-(pH-pH')*1}{k3}\right)} + \left(\frac{P_f}{P_s}\right)',$$

Ecuación 16

$W = -36.5 \pm 1.4$; $(P_f/P_s)' = 36.3 \pm 1.1$; $pH' = 6.6$; y $k3 = 0.73 \pm 0.09$; $R^2 > 0.99$

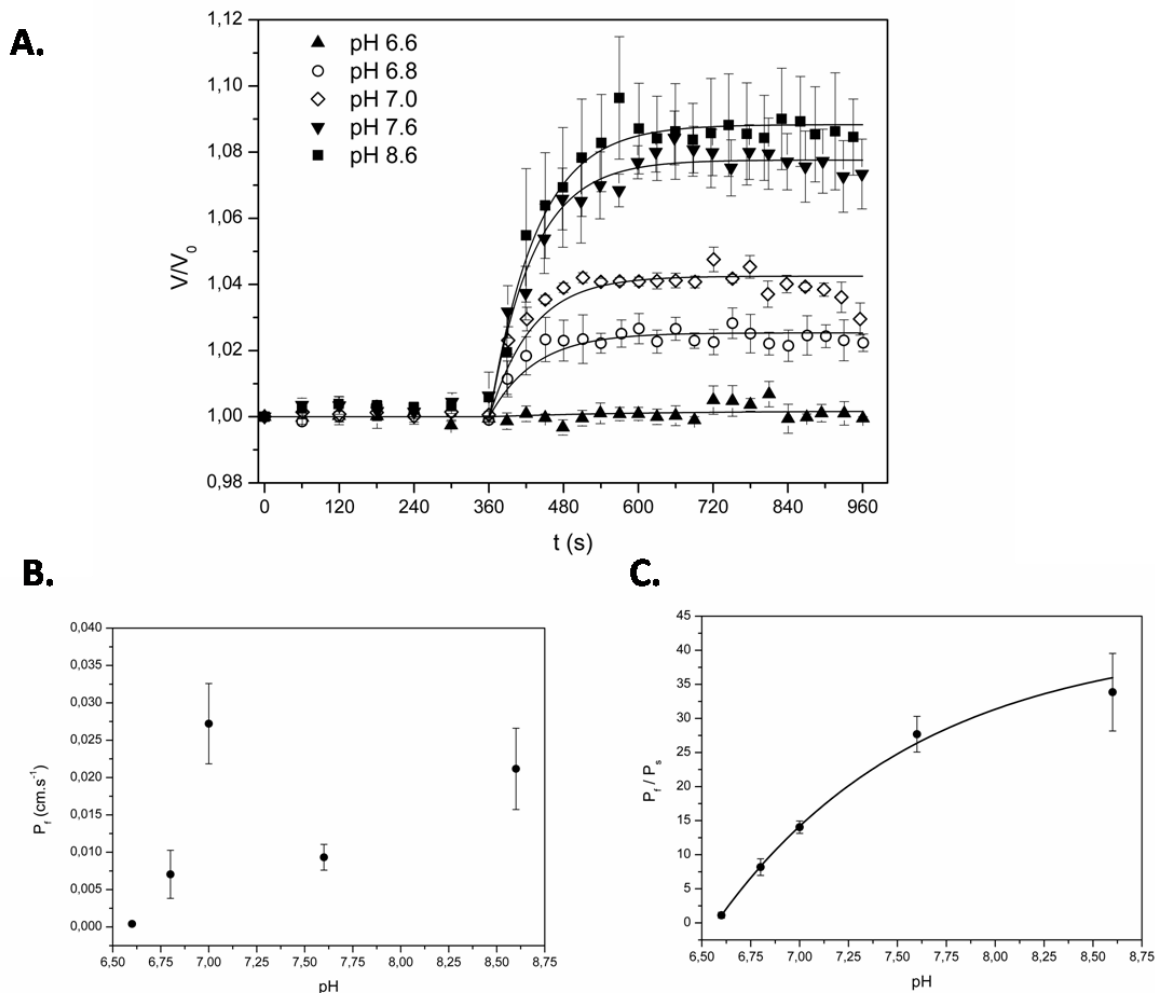


Figura 32: Resultado del ajuste del Modelo de Agua y Solutos a los resultados experimentales de volumen relativo en función del tiempo en condiciones HIPO. A. Volumen relativo en función del tiempo en las condiciones de pH exploradas cuando la vacuola es sometida a un tratamiento HIPO. Los puntos corresponden a los valores experimentales promedio \pm SEM obtenidos en n: 6-7 experimentos independientes. La línea continua representa la curva simulada proveniente del mejor ajuste del Modelo A-S a cada condición de pH. **B.** P_f promedio obtenida del ajuste de todas las réplicas biológicas en función del pH extra-vacuolar. **C.** La relación P_f/P_s en función del pH extra-vacuolar resulta presentar un comportamiento que puede ser descrito a través de una función simple exponencial decreciente. Se representa la media \pm SEM.

5. Determinación de la permeabilidad osmótica del tonoplasto a partir del Modelo de Agua y Solutos

Como se mencionó en la Introducción, la permeabilidad osmótica (P_f) es un parámetro clave y en particular en la vacuola, la P_f es la propiedad intrínseca del

tonoplasto que servirá para valorar cuantitativamente las características de la dinámica del cambio de volumen de la vacuola bajo gradientes osmóticos basados en los formalismos de (Kedem & Katchalski, 1958). La determinación de P_f se abordó a través de una aproximación de modelado. Cada una de las réplicas biológicas independientes de perfusión (HIPO e HIPER) fue utilizada para ajustar el modelo y a partir de este modelo obtener P_f y la permeabilidad a solutos (P_s) del tonoplasto de remolacha.

Los valores de P_f obtenidos del ajuste del Modelo A-S en ambos tratamientos resultó equivalente entre tratamientos, elemento que contribuiría a validar el modelo como medio para caracterizar las propiedades del tonoplasto cuantitativamente (**Figura 33**). En condiciones HIPO a pH 7.6, el valor promedio obtenido fue P_f $(0.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ mientras en condiciones HIPER a pH 7.6 el valor obtenido fue P_f : $(0.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$. En lo que respecta al resultado obtenido para P_s : $(0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ en condiciones HIPER, pH 7.6, fue significativamente menor al obtenido en el tratamiento HIPO, pH 7.6, P_s : $(3.5 \pm 0.7) \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (**Figura 33 B**).

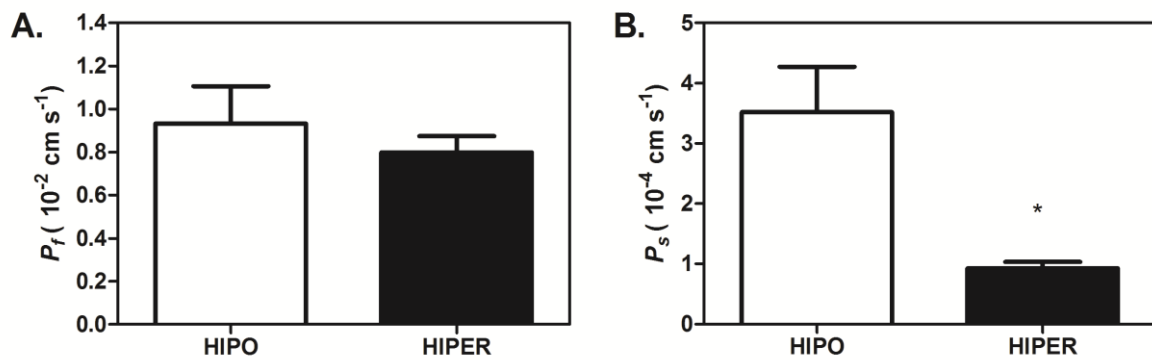


Figura 33: Comparación de los resultados obtenidos para los parámetros del Modelo de Agua y Solutos a partir del ajuste. A. Permeabilidad osmótica promedio (P_f) calculada a partir de los mejores ajustes obtenidos de los experimentos individuales para el tratamiento HIPO e HIPER. **B.** Permeabilidad a solutos promedio (P_s) calculada a partir de los mejores ajustes obtenidos de los experimentos individuales para los tratamientos HIPO e HIPER, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). * t-test, $p < 0.05$.

5.1. Exploración del espacio de parámetros del Modelo de Agua y Solutos en condiciones Hipo-osmóticas

La elección del modelo se realizó a partir de los valores experimentales de cambio de volumen. Los resultados de volumen estacionario obtenidos del ajuste y la predicción del modelo sugieren una aparente dependencia con el pH. Por ello se procedió a realizar una serie de simulaciones ($\sim 1.10^6$) variando P_f y P_s donde obtuvimos los valores de volumen relativo estacionario ($V_f/V_o = V_r$) que satisfacen la relación establecida por el modelo para cada par P_f/P_s (Figura 34). Esta aproximación nos permitió evidenciar que cuando P_f toma valores pequeños (i.e.: 0.005 cm s^{-1}) dentro del rango explorado, existen múltiples valores de P_s que determinan el mismo rango de V_r (1.000 a 1.021). En otras palabras, el movimiento de solutos no tiene un efecto significativo en el cambio de volumen en estas condiciones. En cambio, cuando P_f presenta valores mayores (i.e.: 0.025 cm s^{-1}), el cambio de volumen es fuertemente dependiente de la magnitud del flujo de soluto condicionado por P_s . Pequeñas variaciones en P_s (0.0005 a 0.0010 cm s^{-1}) determinan grandes cambios de V_r (1.064 a 1.100).

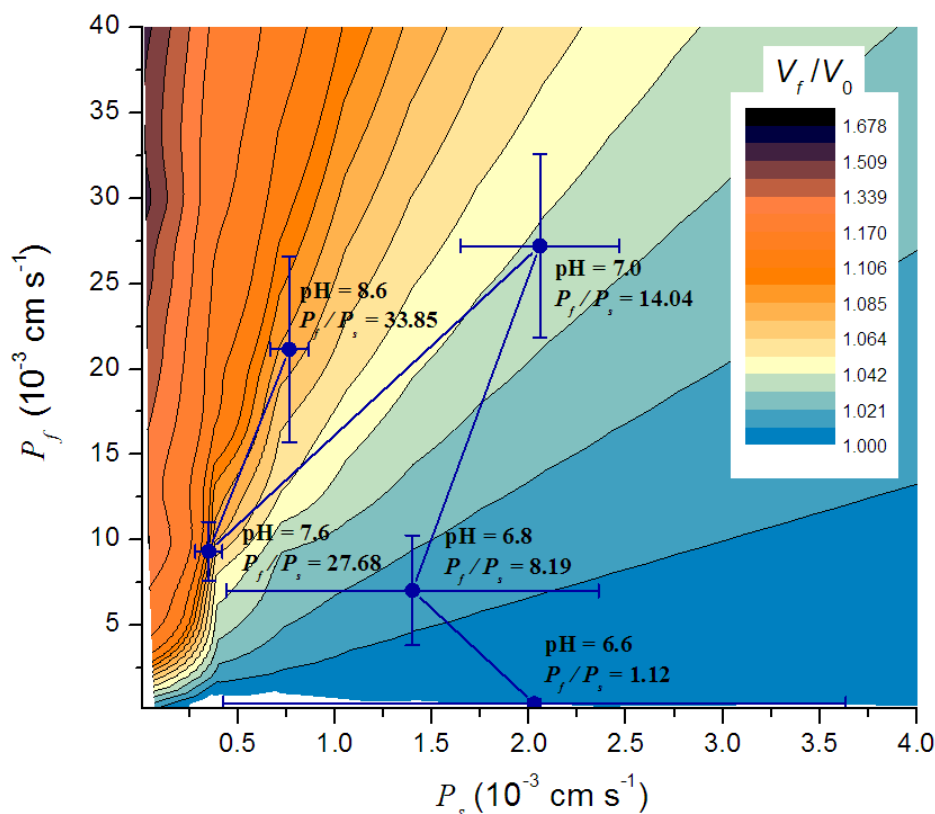


Figura 34: Exploración del espacio de parámetros del Modelo de Agua y Solutos. Se analizó el volumen relativo (V_r) del estado estacionario que devuelve el modelo para un rango amplio de combinaciones de P_f y P_s . Los resultados obtenidos de los ajustes a los diferentes pH se presentan sobre la superficie con un punto azul y se indica el SEM en cada caso.

Discusión

1. Asimetría de la dinámica de cambio de volumen ante los tratamientos HIPO e HIPER

El cambio de volumen que se observó en las vacuolas al alcanzar el nuevo estado estacionario fue marcadamente diferente en el tratamiento HIPO respecto del HIPER a pesar de que el gradiente impuesto fue el mismo en módulo para ambos tratamientos. En la literatura esta asimetría ha sido también reportada para vacuolas aisladas donde el cambio de osmolalidad del medio no se modificó en forma gradual sino en un paso. En estos experimentos se observó que ante condiciones HIPO había un incremento en el volumen vacuolar del 10% antes de la ruptura del tonoplasto, en tanto la reducción de volumen de la vacuola en condiciones HIPER fue del 25% (Morillon & Lasalles, 1999). De acuerdo con algunos reportes bibliográficos la respuesta observada puede atribuirse a las propiedades elásticas de las membranas en estudio (ver más adelante discusión respecto del modelo correspondiente). Si se considera que la vacuola en la célula vegetal ocupa casi el 90% del protoplasma, cabe pensar que su membrana no estaría preparada para grandes incrementos de volumen dada la limitación física impuesta por los propios elementos del citoplasma. El protocolo de aislamiento de las vacuolas aquí utilizado involucró un fuerte *shock* osmótico para desarmar la membrana plasmática y luego la restitución a un medio iso-osmótico del preparado hasta alcanzar un nuevo estado estacionario. *In vivo*, las vacuolas se encontrarían completamente expandidas en el interior de las células del tejido bajo condiciones de máxima turgencia. Previamente, fue reportado para remolacha que una solución 600 mM de manitol es equivalente al potencial hídrico extracelular *in vivo* (Bell *et al.*, 1996) ya que no produce cambios en la turgencia de las células de la corteza en la raíz. En consecuencia, si este medio iso-osmótico determina la máxima extensión del tonoplasto, cuando las vacuolas son sometidas al gradiente hipo-osmótico encontraríamos una limitación física y finalmente la ruptura de las mismas en pocos segundos (Morillon & Lasalles, 1999). A fin de poder explorar la dinámica de cambio de volumen vacuolar seleccionamos una condición donde las vacuolas alcanzaran un nuevo estado estacionario sin presentar la máxima extensión de su membrana (400 mM de manitol). Incluso en estas condiciones experimentales se observó que el cambio de volumen presentado por las vacuolas en condiciones HIPO no superó el 10% del volumen inicial.

En protoplastos de *Raphanus sativus* (rábano), el cambio de volumen observado no solo es simétrico en ambos tratamientos ante gradientes osmóticos equivalentes (Ku wagata *et al.*, 2007), sino que el cambio de volumen observado también sugiere

que solo el movimiento de agua está involucrado en el rango de osmolalidades reportadas (450-225 mOsm Kg⁻¹H₂O). En este mismo sistema, las vacuolas sometidas a un tratamiento HIPER presentan un 30% de reducción de su volumen siendo la reducción menor a la esperada para el cambio de gradiente impuesto. Las diferencias reportadas en el cambio de volumen entre protoplastos y vacuolas se ha atribuido a la expansión del área efectiva en el protoplasto dada la presencia de invaginaciones de la membrana plasmática, en tanto esto no sería posible en las organelas internas como las vacuolas (Wolfe & Steponkus, 1981; Wolfe *et al.* 1986; Ramahaleo *et al.*, 1999). En los tradicionales estudios de canales realizados en vacuolas de remolacha ya se había reportado que el estrés hiper e hipo-osmótico inducía un cambio de corriente iónica de la membrana de la vacuola, siendo mayor la corriente observada en el gradiente HIPER (Alexandre *et al.*, 1991). Estos reportes concuerdan con la hipótesis de que el volumen estacionario alcanzado bajo ambos tratamientos está asociado a mecanismos complementarios junto al movimiento osmótico de agua como había sido propuesto en la literatura para este sistema (Amodeo *et al.*, 2002).

La asimetría observada no se entendería exclusivamente en términos de la cinética en que se impone el gradiente, sino que sugiere la presencia de mecanismos alternativos asociados al cambio de volumen de la vacuola en condiciones HIPO respecto de condiciones HIPER.

2. Modelado de la respuesta osmótica en las vacuolas de raíz de remolacha

La estrategia de modelado permitió determinar para las condiciones experimentales la permeabilidad al agua (P_f) del tonoplasto incorporando al sistema un gradiente efectivo que varió progresivamente en el tiempo. De los supuestos que se propusieron para cada modelo, el modelo de agua y solutos fue el que mejor predijo los resultados experimentales, por lo que además de P_f , fue posible obtener de este sistema un segundo y valioso parámetro asociado al tonoplasto: P_s . Varios modelos matemáticos han sido propuestos en la literatura para simular el transporte de agua y solutos a través de la membrana plasmática y el tonoplasto de las células vegetales (Wendlert & Zimmermann, 1985; Zhang & Tyerman, 1999; Kuwagata *et al.*, 2007). Aquí se presentó un enfoque de modelado que: 1) se centra sólo en los procesos de transporte que se producen a través de la membrana de la vacuola; 2) incorpora un gradiente osmótico aplicado progresivamente determinado experimentalmente.

A diferencia de otros modelos publicados en la literatura, este sistema de perfusión propició una modificación progresiva del gradiente impuesto e impone la necesidad

de controlar el gradiente efectivo a lo largo del tiempo. Esta modificación en el sistema introdujo una condición semejante a los cambios reportados para el citosol (Ferrier *et al.*, 1977). En el parénquima de la raíz almacenadora de remolacha, se ha propuesto que el almacenamiento de sacarosa depende de un gradiente gradual a lo largo del órgano. Aquí, es plausible suponer que la distribución de canales y transportadores a lo largo de las membranas podría también tener una distribución heterogénea y, en consecuencia, los estudios a nivel organela se vuelven relevantes (Draycott, 2006). Los experimentos de video-microscopía en este trabajo proveen resultados de la vacuola en forma individual en lugar de una población de vesículas aisladas como los experimentos de dispersión de luz (*light scattering*) (Alleva *et al.*, 2006; Sutka *et al.*, 2005). Se debe tener en cuenta que los experimentos en vesículas aisladas de tonoplasto permiten obtener información de las propiedades intrínsecas de una fracción purificada de membrana (en nuestro caso tonoplasto) que representa a una extracción del parénquima, mientras que aquí la aproximación experimental donde se visualiza una vacuola provee información sobre comportamiento integral del tonoplasto en la organela aislada.

3. Los Modelos de Agua y de Agua y Volumen no osmótico no reproducen los resultados de volumen relativo obtenidos durante la perfusión en los tratamientos HIPO e HIPER

Los resultados obtenidos del ajuste de los Modelos de A y A- V_b verificaron que la entrada de agua bajo las suposiciones propuestas no explica apropiadamente la dinámica del cambio de volumen observado (**Figura 30 y Figura 31**), compatible con lo anteriormente reportado para este mismo sistema (Amodeo *et al.*, 2002). Asimismo, el valor obtenido por ajuste de P_f ha resultado un orden de magnitud inferior a los reportados en la bibliografía que se encuentran en el rango : $10^{-1} - 10^{-3}$ cm s⁻¹, (Maurel *et al.*, 1997; Niemietz & Tyerman, 1997; Morillon & Lasalles, 1999; Sutka *et al.*, 2005). En conjunto ambos elementos contribuyen a ratificar que en este sistema el cambio de volumen no estaría mediado exclusivamente por el flujo osmótico de agua.

4. El Modelo de Agua y tensión de la membrana sugiere que el tonoplasto es extremadamente rígido bajo tratamiento HIPO

Se evaluó la contribución de la tensión de turgencia y su relación con la elasticidad de la membrana como elemento involucrado en la respuesta observada (Modelo de A- \mathcal{E}). Bajo las suposiciones de este modelo se ha determinado la magnitud del coeficiente elástico volumétrico (\mathcal{E}) del tonoplasto análogamente a lo propuesto en

células animales y vegetales (Steudle *et al.*, 1977; Husken *et al.*, 1978; Nobel, 2009; Ozu *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos del ajuste para \mathcal{E} resultaron semejantes a los reportes disponibles para la pared celular de las plantas (1 a 50 MPa, Nobel 2009). En protoplastos -células despojadas de la pared celular- la resistencia mecánica del sistema se reduce. Se ha reportado que en protoplastos aislados de *Arabidopsis* se produce su lisis cuando la presión interna alcanza 0.003 MPa (Wolfe *et al.*, 1986). En este sistema, la vacuola, el resultado del ajuste sugiere que un cambio grande de presión turgente desencadena solo un pequeño cambio de volumen. Por lo tanto, el tonoplasto se trataría de una membrana mucho más rígida que otras membranas celulares descritas. En la literatura se ha propuesto que la tensión soportada por el tonoplasto no alcanza la magnitud que soporta la pared celular –principal estructura mecánica en las células vegetales- (Peyronnet *et al.*, 2014). Los reportes de presión osmótica para el citosol y el interior de la vacuola son muy similares *in vivo*, sugieren que el rol de esta organela está más ligada al almacenamiento de solutos más que a la generación de presión turgente en el interior celular (Beauzamy *et al.*, 2014). En este aspecto, podemos especular que la vacuola de remolacha sería crucial en la recirculación de solutos como actor del proceso de osmorregulación. Por lo tanto, a pesar de su capacidad de ajuste, este modelo fue descartado para explicar la dinámica de cambio de volumen en la vacuola de *Beta vulgaris* bajo condiciones HIPO.

5. El Modelo de Agua y Solute es el que mejor ajusta a los resultados de cambio de volumen en función del tiempo tanto bajo el tratamiento HIPO como HIPER

A partir de los resultados experimentales se ajustaron los modelos propuestos que describen el cambio de volumen de vacuolas aisladas bajo las condiciones HIPO e HIPER, contemplando la cinética de cambio de osmolalidad. En estos modelos se incorporó un elemento que compensa el incremento de volumen promovido por el ingreso del flujo osmótico de agua. En ambos tratamientos el modelo que mejor ajustó es el Modelo de A-S. En el tratamiento HIPO, este modelo describe el cambio de volumen a partir de la entrada de agua y salida de solutos, este elemento contribuiría a disipar el gradiente efectivo a través del tonoplasto progresivamente a lo largo de la perfusión. Este resultado es compatible con los resultados reportados que proponían que un incremento en la turgencia favorece la pérdida de solutos en los tejidos almacenadores (Ehwald *et al.*, 1980; Perry *et al.*, 1987; Fritz *et al.*, 2011). Asimismo, el cambio de volumen de la vacuola en el tratamiento HIPER estaría

mediado por la salida de agua y entrada de solutos bajo un razonamiento análogo al propuesto en el caso HIPO.

La inclusión del volumen no osmótico como parámetro del modelo no revistió en un mejor ajuste en ninguno de los dos tratamientos. El criterio para descartar el Modelo de A-S- V_b se basó en el número de parámetros que definen el modelo. El ajuste de este modelo y el Modelo de A-S presentan semejante capacidad, siendo este último más sencillo por estar definido por menos parámetros, por lo que se consideró el más apropiado de acuerdo con el principio de parsimonia. En el caso de nuestros ajustes a pH 7.6, el V_b fue de 0.10 en HIPO, y del 0.01 en HIPER (**Tabla 3** y **Tabla 4**). A diferencia de los demás parámetros obtenidos, no se encuentran reportes relacionados con la fracción de volumen no osmótico para la vacuola por lo que no es posible darles una interpretación a los valores obtenidos. En cambio, en otras organelas (cloroplastos) se ha reportado que los cambios de V_b están asociados a los depósitos de almidón y a la tasa fotosintética. En cloroplastos de *Pisum sativum* (guisante) hay una reducción de la fracción de volumen no osmótico en la oscuridad (41%) respecto de la fracción reportada cuando se encuentran iluminados (59%, Nobel, 2009). En protoplastos, el rango reportado es muy amplio, se haya asociado a diferentes tipos celulares y condiciones del entorno. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* en protoplastos de mesófilo es del 14.4%, en granos de polen alcanza un valor del 52% (Sommer *et al.*, 2007), mientras en algas halófilas se han reportado un V_b entre 60-80 % (Rabinowitch *et al.*, 1975).

En el tratamiento HIPO, en el rango de pH probado, V_b toma valores entre 10% a pH 7.0 a 91% a pH 6.8, mostrando un comportamiento no monotónico respecto del pH. Se requieren nuevos experimentos donde caracterizar el volumen no osmótico de la vacuola a través de un método alternativo como pueden ser las curvas de Boyle-Van't Hoff (Sommer *et al.*, 2007) y probar en forma independiente si este contribuye a la respuesta observada y/o existe una dependencia entre el V_b y el pH en la vacuola.

En el Modelo de A-S las suposiciones establecidas para el tratamiento HIPO y para el tratamiento HIPER supone la reversibilidad del flujo de agua a través del tonoplasto. Esta suposición ya había sido postulada para diferentes sistemas y se verificó a partir de los valores de P_f obtenidos (Meinild *et al.*, 1998). En tanto esta suposición, no necesariamente es válida para el movimiento de solutos, no sólo a la luz de los valores obtenidos del ajuste sino también dadas las características del sistema en estudio (**Figura 33**). No es menor mencionar que este elemento contribuye a fortalecer la hipótesis según la cual los actores involucrados en condiciones HIPO no son los mismos que en condición HIPER. En este punto, a la

luz de nuestros resultados la asimetría observada entre los tratamientos estaría mediada principalmente por el componente de solutos del modelo.

6. La respuesta del sistema y del modelo bajo el tratamiento HIPO a diferentes pH

La introducción de los tratamientos a diferentes pH fue la estrategia para analizar la respuesta del sistema bajo condiciones donde el movimiento de agua se encontrara inhibido (Sutka *et al.*, 2005; Leitao *et al.*, 2012). Se corroboró que el Modelo de A-S ha presentado el mejor ajuste en todas las condiciones de pH probadas. Asimismo, los valores de P_f provenientes del ajuste presentan una dependencia análoga con el pH a la reportada en vesículas de tonoplasto por la técnica de *stopped-flow* donde las vesículas son sometidas a un tratamiento HIPER (Sutka *et al.*, 2005). Dado que se carece de los valores de permeabilidad osmótica en estas mediciones, sólo es posible comparar los perfiles de respuesta al pH. En ambos casos se observa la misma dependencia funcional de la permeabilidad al agua con el pH de la solución. Este resultado contribuiría a respaldar que el flujo de agua en el tonoplasto no está rectificado (como sucede en el flujo generado en algunos canales iónicos), sino que es bidireccional como ha sido propuesto para las acuaporinas (K. Meinild *et al.*, 1998). Es interesante que la máxima permeabilidad al agua observada en ambos sistemas se presenta al pH donde el intercambio de protones a través del tonoplasto también presenta máxima actividad a pH: 7.5 (Giannini *et al.*, 1987). En los estudios tradicionales sobre membranas y ósmosis la incorporación de acuaporinas o de poros en las membranas capaces de transportar agua determina un cambio en la velocidad en que se produce el cambio de volumen osmótico (Finkelstein, 1987). A diferencia de lo reportado en protoplastos cuando el flujo de agua se haya inhibido a pH ácidos, en este sistema además se observa una modificación del volumen final alcanzado. La dependencia no lineal observada para la relación entre P_f/P_s bajo diferentes condiciones de pH podría atribuirse al efecto de pH sobre el volumen final en el estado estacionario en plantas. Dada la interrelación existente entre los tres parámetros a partir de la determinación de P_f y el volumen final del estado estacionario (V_r), en este sistema la relación P_f/P_s permite predecir el volumen relativo del estado estacionario para las diferentes condiciones de pH del rango explorado (6.6-8.6). Estos resultados proveen información cuantitativa respecto a la relación existente entre el flujo de agua y solutos durante la homeostasis de la vacuola bajo condiciones hipo-osmóticas.

Las diferencias entre los tratamientos HIPO e HIPER también han sido reportadas en relación a la actividad de los transportadores y del pH. En tomate, bajo condiciones

hipo-osmóticas se reporta una mayor contribución de los transportadores, observándose una rápida alcalinización ligada a la extrusión de K^+ que no es simétrica bajo condiciones hiper-osmóticas. No es menor mencionar que en este sistema el mecanismo de sensado de osmolalidad se activa ante ciertos valores absolutos de presión osmótica y no ante un valor relativo de gradiente (Felix *et al.*, 2000). En todos los casos los parámetros obtenidos a partir del ajuste suponen que estas propiedades no se modifican a lo largo del ensayo. No se puede descartar que la relación entre P_i , P_s , pH esté mediada por umbrales de potencial osmótico que desencadenen la participación de uno por sobre el otro en la dinámica del volumen vacuolar.

Dentro de nuestro enfoque, la incorporación de la cinética de cambio de osmolalidad externa en función del tiempo constituye un aporte significativo al estudio de la permeabilidad al agua. Especialmente se puso en evidencia la relevancia de la complejidad de los sistemas y la necesidad de producir modelos integrados para poder relacionar cuantitativamente la dinámica del volumen vacuolar con los flujos de agua y solutos.

7. Una interpretación acerca de la relevancia del flujo de solutos en la dinámica del volumen vacuolar

Los formalismos propuestos para el Modelo de Agua y Solute refieren al movimiento de un soluto que no afecte el potencial de membrana y no distingue en cuanto a su identidad. La incorporación de este elemento al modelo determina que existe un cambio en la osmolalidad a través del tonoplasto además del cambio impuesto con manitol. Los tratamientos HIPO e HIPER han mostrado ser bien representados por el modelo de Agua y Solutos, donde existiría un flujo de solutos inespecífico de sentido opuesto al flujo de agua que disiparía el gradiente efectivo a través del tonoplasto y por ende cambiaría el volumen estacionario final. Dadas las dimensiones de la vacuola, los tiempos del experimento, y el dispositivo experimental, tanto la salida de solutos como la entrada de solutos no son apreciables en las determinaciones experimentales, pero contribuirían a modular el volumen final alcanzado en la escala de la vacuola. Surgen nuevas interrogantes, ¿cuál podría ser el soluto? ¿Cómo explicar la respuesta en los tratamientos HIPO e HIPER? ¿Qué validez tienen las suposiciones del modelo?

En *Beta vulgaris* existen evidencias que señalan que solutos cargados como el K^+ , Na^+ , aminas y betalainas son esenciales en el equilibrio osmótico de las elevadas concentraciones de sacarosa almacenadas en la vacuola (Alexander, 1971; Kholodova *et al.*, 1989). Bajo los supuestos de modelo el soluto involucrado sería

aquel que no modifica el potencial electroquímico de la membrana. Entonces deberían descartarse que los transportadores de K^+ , extensamente estudiados en este sistema, estén involucrados en la respuesta (la solución del medio no tiene además iones). Por lo que en la respuesta observada podría estar mediada por un soluto no cargado como fructosa y/u otros compuestos orgánicos (Giaquinta, 1977; Wyse, 1979; Martinoia *et al.*, 2007).

En los experimentos realizados, las vacuolas aisladas se consideraron en estado estacionario con el medio externo en tanto a pH y potencial osmótico al comienzo. Por lo tanto, podría estimarse que en las condiciones de trabajo la vacuola prácticamente carece de solutos móviles, a raíz de que han sido equilibradas en un medio mínimo (Ver **Tabla 8**). Esta consideración resulta demasiado simple, puesto que estar en equilibrio con el medio externo no excluye que en su interior almacene solutos no cargados como sacarosa y los pigmentos que le confieren su coloración. Por ende, en condiciones HIPO estos solutos podrían ser los actores sugeridos en tanto salida de solutos. En cambio, en el tratamiento HIPER, el ingreso de solutos estaría ligado a nuevos solutos (en particular, el ingreso de manitol) hasta el momento entendido como no permeable. Los valores menores provenientes del ajuste de P_s en condiciones HIPER respecto de HIPO podrían sugerir que el soluto en movimiento es otro. Ahora bien, si el tonoplasto fuera levemente permeable al manitol existiría siempre una tendencia a la entrada como consecuencia de la elevada concentración del medio externo. Se requerirían nuevos experimentos para poder evaluar esta hipótesis, donde el sistema luego del equilibrio al introducir el cambio siempre contaría con una corriente mínima de entrada de manitol.

En el tonoplasto de *Beta vulgaris*, se ha propuesto al K^+ y la sacarosa como los principales osmolitos involucrados en la osmoregulación. Bell y colaboradores en 1996 evaluaron las tasas de entrada y salida de estas especies químicas a través de la membrana plasmática y el tonoplasto ante cambios de la turgencia en el tejido. Cuando el tejido experimenta un incremento de turgencia por entrada de agua (HIPO), hay una salida neta de K^+ al medio extracelular como consecuencia de un decrecimiento de la captación por la membrana plasmática y el tonoplasto; en tanto la sacarosa se acumula en el citosol a expensas de la disminución en la captación de la vacuola. Estos autores reportaron no poder determinar precisamente qué ocurre con la tasa de salida desde el tonoplasto en estas condiciones tanto para K^+ como para sacarosa. Por lo tanto, no es posible descartar que exista salida de solutos desde la vacuola como parte del mecanismo. Cuando en el tejido el potencial hídrico del medio extracelular se reduce (HIPER) ambos osmolitos aumentan su tasa de ingreso hacia la vacuola, para restaurar de esta forma el potencial que mantiene el

ingreso de agua. Este modelo fue propuesto en base a experimentos realizados a pH 6.5, detalle que es interesante mencionar puesto que es una condición donde la vacuola no experimenta cambio de volumen apreciable dado que la permeabilidad osmótica se encuentra inhibida en un 100%, incluso es muy baja también en estas condiciones la permeabilidad osmótica de las vesículas de membrana plasmática (Alleva *et al.*, 2006). En todos los casos, esta propuesta acuerda con la presencia de un mecanismo compensatorio mediado por solutos como el propuesto para los cambios de volumen vacuolar donde no se encuentra afectado por pH el movimiento de agua a través de las membranas.

Conclusión

- El cambio en el volumen relativo hasta un nuevo estado estacionario registrado en las vacuolas de *Beta vulgaris* es diferente en el tratamiento HIPO respecto del HIPER a pesar de que el gradiente fuera en módulo el mismo para ambos tratamientos.
- La asimetría observada no se entendería exclusivamente en términos de la cinética en que se impone el gradiente, sino que sugiere la presencia de mecanismos alternativos asociados al cambio de volumen de la vacuola en condiciones HIPO vs. HIPER.
- El modelo de Agua y Solutos fue el que mejor predijo los resultados experimentales, por lo que además de P_f fue posible obtener de este sistema un segundo parámetro asociado al tonoplasto: P_s tanto en condiciones HIPO como HIPER.
- Los valores de P_f obtenidos del ajuste del modelo en ambos tratamientos resultaron equivalentes entre tratamientos HIPO e HIPER.
- Los valores de P_s obtenidos del ajuste del modelo en ambos tratamientos resultaron menores para el tratamiento HIPER respecto a HIPO. Este elemento contribuye a fortalecer la hipótesis según la cual los actores involucrados en condiciones HIPO no son los mismos que en condición HIPER. En este punto, de acuerdo con los resultados aquí presentados esta asimetría estaría mediada principalmente por el componente de solutos del modelo.
- Dada la interrelación existente entre los tres parámetros a partir de la determinación de P_f y el volumen final del estado estacionario (V_f), en este sistema la relación P_f/P_s permite predecir el volumen relativo del estado

estacionario para las diferentes condiciones de pH del rango explorado (6.6-8.6).

Discusión general



La caracterización de las propiedades hidráulicas en distintas especies vegetales es una de las estrategias clásicas en los estudios agronómicos y fisiológicos para evaluar la tolerancia y capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales donde la disponibilidad del agua puede resultar crítica. En estos sistemas, bajo los supuestos del estado estacionario, se han utilizado las leyes fenomenológicas de la ósmosis para describir el flujo de agua a nivel celular, y la ley de Ohm para describir el flujo de agua desencadenado por diferencia de potencial hídrico en la planta entera. Las leyes mencionadas resultan suficientes para describir las principales propiedades hidráulicas: la permeabilidad osmótica de las membranas (P_f) y la conductividad hidráulica de un órgano (L_{pr}). Ambas cualidades estiman el flujo de agua pasivo por unidad de gradiente impulsor. Esta aproximación metodológica provee información acerca de las propiedades de una planta en un momento dado, es decir en un estado. En este trabajo se evaluaron estas propiedades hidráulicas en una condición experimental tal que *forzara en la planta* una modificación de ese estado estacionario alcanzado. Esta estrategia tuvo por objetivo no simplemente caracterizar un cambio de estado en la planta, sino evaluar cómo las propiedades hidráulicas se modulan durante la transición entre estos estados estacionarios.

En los últimos 30 años ha habido importantes avances en la caracterización de los actores involucrados en la modulación de la vía celular y el transporte de agua: canales iónicos, acuaporinas, factores de transcripción, genes, etc. En los últimos cuatro años se ha comenzado a integrar estos elementos en el marco del fenotipado, a partir de modelos hidráulicos para describir los cambios en el estado hídrico en diferentes especies (Draye *et al.*, 2010; North *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2014; Zeppel *et al.*, 2014; Tardieu *et al.*, 2015; Yaaran & Moshelion, 2016). En esta Tesis integró la respuesta desencadenada en la raíz con eje en la participación de la vía celular dentro de la modulación hidráulica de la planta entera. Las estrategias experimentales desarrolladas verificaron las dos propiedades esenciales de las membranas en los sistemas biológicos: i) la especificidad ligada a la identidad de los cationes y ii) el transporte activo.

La aproximación de modelado utilizada para determinar la P_f en el tonoplasto resultó una poderosa herramienta para probar posibles hipótesis acerca del mecanismo involucrado en el cambio de volumen de la vacuola. La asimetría entre las condiciones experimentales hiper e hipo-osmóticas (HIPER e HIPO) sugiere que el transporte podría ser complejo y requiere de nuevas hipótesis y ensayos experimentales para explicar el mecanismo subyacente al fenómeno de cambio de volumen de la vacuola en condiciones aniso-osmóticas. Dicha ampliación

experimental va más allá del alcance de esta Tesis y permance como propuesta de trabajo a futuro. El Modelo de Agua y Solutos seleccionado subraya la relevancia que tiene el acople del transporte de agua con el transporte de solutos. Este resultado ha sido consistente con las propiedades de transporte activo propuesto a partir de los experimentos de exudado libre medidos en la raíz entera.

En la raíz entera, la contribución de la vía radial apoplástica al flujo de agua transportado no supera el $\cong 9\%$ de la capacidad de transporte total de la raíz y el agua movilizadada por la vía celular representaría el $\cong 11\%$. Aunque la naturaleza del gradiente de potencial que promueve el flujo de agua es diferente para cada uno de estos caminos, ambos caminos contribuirían en forma semejante al flujo total transportado. De acuerdo a los resultados de esta Tesis, la conductividad osmótica de la raíz (L_{po}) podría explicarse únicamente acoplada a un mecanismo de transporte activo puesto que el gradiente de potencial determinado supone un flujo de agua con dirección opuesta a la observada. Es necesario diseñar nuevos ensayos para determinar si el flujo exudado en forma espontánea por la vía celular en la raíz es suficiente para sostener el metabolismo de la planta aún bajo condiciones desfavorables (Wegner, 2014). En cuanto a la participación de la tensión durante la noche (período de oscuridad en la cámara de crecimiento), recientemente ha sido descrito como esencial en algunas especies vegetales para sostener el estado hídrico de la hoja (Huang *et al.* 2016).

El modelo compuesto de Steudle propone que cuando el gradiente de potencial hídrico es desfavorable, existiría una pérdida de agua a través de la vía apoplástica en la raíz. En los experimentos descritos en el primer capítulo el cambio de fenotipo observado podría atribuirse a la pérdida por esta vía de pérdida (cuando pierden turgencia las hojas). El cambio del contenido de agua no superará un 2 % de los niveles presentes en las plantas antes del tratamiento. Es interesante el fenotipo de *Beta vulgaris* que recupera la turgencia aún en un gradiente desfavorable dentro de las 24 h. Puede atribuirse a la redistribución de agua desde el interior de los tejidos y al incremento de la deposición de suberina que impediría un movimiento retrógrado de agua a través del apoplasto.

En conjunto, los resultados aquí obtenidos no sólo subrayan la importancia de la vía celular en la raíz sino también la importancia de la interrelación entre las propiedades hidráulicas. En *Beta vulgaris*, fenotipos muy diferentes en la planta presentan propiedades hidráulicas similares en la raíz. En el primer capítulo, las modificaciones en la deposición de suberina no determinaron diferencias en L_{pr} . Por lo tanto, la transición entre los estados estacionarios no se podría caracterizar a través de este

parámetro. En el segundo capítulo, la forma en que se modifica L_{po} no reflejó las propiedades de L_{pr} . Estos resultados sugieren que el modelo que integre la respuesta es más complejo que la simple adición de los componentes.

L_{pr} resultó especialmente sensible al gradiente de potencial hídrico entre la vasculatura y el suelo. Esto subraya la interdependencia entre las propiedades de la parte aérea y la raíz. Esta dependencia de L_{pr} respecto a los elementos asociados al gradiente de potencial hídrico constituye una diferencia sustancial respecto a los formalismos de las leyes fenomenológicas donde la conductividad es una constante de proporcionalidad entre gradiente y flujo. Por ello, en este marco es necesario revisar las limitaciones que presentan los supuestos de los modelos hasta aquí aceptados para describir el movimiento de agua en plantas.

El ajuste hidráulico observado en la raíz en este modelo halo-tolerante es diferente a lo reportado para otras especies vegetales. Acorde con las propuestas del modelo compuesto, se observa un cambio de tipo llave encendido (*switch*) que estaría mediado por el gradiente de potencial hídrico sobre L_{pr} . En contraste con la propuesta del modelo compuesto, el *switch* no estaría exclusivamente asociado a la presencia de una barrera física. Como contrapunto, a nivel celular la modulación de L_{po} está directamente asociada a la presencia del catión que confiere la salinidad. Es necesario evaluar esta respuesta en presencia de otros agentes para verificarlo.

Como se mencionó, estos resultados sugieren que el circuito hidráulico subyacente es más complejo que un conjunto de dos resistencias asociadas en paralelo. En este contexto sería interesante determinar mediante técnicas con mayor sensibilidad la capacidad de transporte de la vía celular o de la raíz y de esta forma poder proponer modelos que den cuenta de una nueva topología para el circuito hidráulico.

En algunas especies vegetales se ha observado que el flujo de agua a través de la planta está fuertemente determinado por la dirección del gradiente de potencial hídrico (Reef & Lovelock, 2015). En cambio, en *Beta vulgaris* los resultados sugieren que en la dirección del flujo de agua no se encuentra simplemente sujeta al gradiente de potencial hídrico, sino que existen mecanismos sumamente específicos para sostener y garantizar la entrada de agua desde el medio externo hacia la parte aérea. Sin dudar este tipo de estrategia está ligada a su cualidad halotolerante. En este trabajo se ha realizado un análisis sobre cómo los componentes hidráulicos se articulan para dar esta respuesta. Las evidencias halladas permiten sugerir que la vía celular activa de la raíz participa en sostener el flujo de agua desde la raíz hacia la parte aérea en *Beta vulgaris* y entre los elementos claves estaría un reducido apoplasto radial, un *switch* que no es físico y un acoplamiento de flujo de agua a un mecanismo de transporte activo.

Materiales y métodos

1. Cultivo hidropónico de plantas de remolacha roja

Las plantas de remolacha roja (*Beta vulgaris* var. Detroit) se cultivaron en condiciones ambientales controladas: ciclo de luz/oscuridad 16/8 horas (intensidad de luz en PAR²⁹ de $(100 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1})$, temperatura $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $(49.0 \pm 2.5) \%$. Los resultados que se presentaron en el Capítulo 2, se cultivaron en condiciones ambientales controladas con pequeñas modificaciones respecto del Capítulo 1: ciclo de luz/oscuridad 16/8 horas ($168 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR), temperatura $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $(56.2 \pm 6.8) \%$. Se realizaron los experimentos con semillas de dos lotes diferentes sin observarse diferencias significativas. Es importante destacar que las semillas no son clones por lo tanto en todos los experimentos parte de la dispersión de los resultados se puede atribuir a la variabilidad biológica entre los individuos.

El sistema de cultivo en hidroponía se desarrolla en tres etapas: i- germinación de las semillas de remolacha roja (día 1 a 10), ii- desarrollo en hidroponía (día 11 a 21) y iii- aplicación del tratamiento (día 21 a 23).

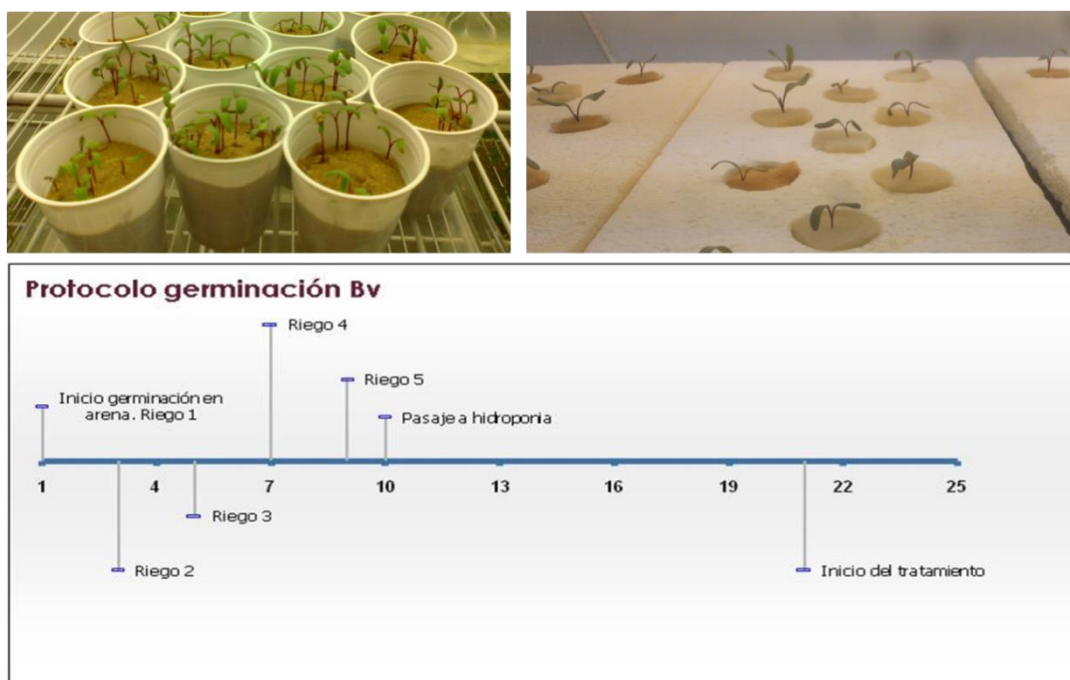


Figura 35: Esquema del protocolo de germinación de las plantas de remolacha. A partir de semillas comerciales de remolacha variedad Detroit se germinaron las plántulas en arena dentro de contenedores plásticos (5 cm de diámetro). El riego con SH se realizó día por medio hasta el día 10, cuando las plantas germinadas presentaron las dos hojas cotiledonales expandidas. Ese día se transfirieron las plántulas al sistema hidropónico donde los recipientes se encontraban con aireadores, $(8.9 \pm 0.3) \text{ mg L}^{-1}$ de O_2 , y conteniendo hasta un volumen máximo de 5.8 L de SH (fotografías superiores). En el día 21, las plantas presentaron las dos primeras hojas verdaderas expandidas y se inició el tratamiento. Bv: *Beta vulgaris*.

²⁹ PAR: refiere por sus siglas en inglés a “*photosynthetically active radiation*”, en español radiación fotosintéticamente activa

Etapa i - Germinación de las semillas de remolacha roja (día 1 a 10)

Las semillas germinaron en contenedores de plástico de 5 cm de diámetro provistos con tres cuartos de su capacidad con arena previamente esterilizada. Los recipientes fueron colocados en una bandeja a la que día por medio se la cargó con medio de cultivo hidropónico (SH). Luego de 2 a 3 min, cuando se verifica que toda la arena de cada contenedor con semillas se encontraba humedecida con SH se retiraba el remanente de solución de la bandeja.

Etapa ii - Desarrollo en hidroponía (día 11 a 21)

Diez días después de la siembra, las plántulas saludables fueron transferidas al sistema de hidroponía. Primero se removió la arena adherida a la superficie de la raíz enjuagándola suavemente con agua corriente, luego se tomó cada una de las plántulas y su hipocotilo se envolvió con goma espuma para colocarlo dentro de una de las perforaciones de una plancha de telgopor (**Figura 35**, fotografía superior derecha). La plancha conteniendo 11 plántulas se apoyó cubriendo un recipiente plástico de 5.8 L con solución Hoagland (**Tabla 7**, SH) de manera que sólo las raíces quedaran sumergidas en el medio. La oxigenación de la solución se realizó mediante burbujeo de aire a través de un sistema de mangueras interconectadas a un aireador comercial de pecera ($8.9 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ de O_2 disuelto, sensor de oxígeno, DO-5510, Hanna instruments). Las plántulas crecieron durante 11 días en estas condiciones hasta la aplicación del tratamiento. Los recipientes fueron recargados con SH para compensar pérdidas por evapotranspiración día por medio (cada 2 días).

Etapa iii - Aplicación del tratamiento (día 21 a 23)

Después de 21 días de la siembra, las plantas desarrollaron las dos hojas verdaderas expandidas. En este día, la SH de las macetas fue suplementada con la masa de sal suficiente para producir la concentración final deseada. Un conjunto de macetas no recibió sal y fue utilizada como *control*.

2. Tratamientos aplicados a las plantas de remolacha en cultivo hidropónico

La SH de las macetas fue suplementada con la masa de sal suficiente para producir la concentración final deseada, basado en la capacidad de la maceta (5.8 L):

- Capítulo 1: 200 mM de NaCl o KCl mM, de acuerdo con el peso molecular de cada una de las sales
- Capítulo 2: 50, 100, 125, 150, o 200 mM de NaCl (PM: 58.44)

En todos los experimentos realizados la osmolalidad de las soluciones fue determinada para corroborar el gradiente de osmolalidad impuesto, utilizando un osmómetro comercial de presión de vapor (VAPRO 5520, Wescor, Logan, UT, EE.UU.). El tratamiento se inició siempre al comienzo del ciclo de luz (9 am) en el día 21 desde la siembra. En los sucesivos resultados este instante se representó como el tiempo 0 h, inicio del tratamiento. Los tiempos de cosecha de material o tiempos en que se midió algún parámetro fueron referidos a este tiempo 0h (t: 0h).

Tabla 7: Composición de la solución Hoagland (SH). La solución Hoagland modificada (SH) que se utilizó durante el riego y en el sistema de cultivo hidropónico fue realizada de acuerdo con el protocolo publicado por Javot *et al.*, 2003. Esta solución presentó un pH = 6.4 ± 0.1 y una osmolalidad (44 ± 12)³⁰ mOsm Kg H₂O⁻¹. En estas condiciones de pH se espera una máxima disponibilidad de los nutrientes a partir de las sales utilizadas en la preparación y la osmolalidad no constituye una condición de estrés salino (700-800 µS) significativo para una halo-tolerante.

Macronutrientes		Micronutrientes	
Componentes	Concentración (mM)	Componente	Concentración (µM)
KNO ₃	1.25	H ₃ BO ₃	50
CaNO ₃	1.50	MnSO ₄	12
MgSO ₄ .H ₂ O	0.75	CuSO ₄	0.7
KH ₂ PO ₄	0.50	ZnSO ₄	1
		Na ₂ MoO ₄	0.24
		FeEDTA	50
		Na ₂ SiO ₃	100

3. Parámetros medidos en las plantas de remolacha roja

3.1. Biomasa

Las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos se cosecharon separando el vástago y la raíz. La cosecha fue realizada en forma aleatoria para evitar un desfase temporal entre los tratamientos. En cada una de las muestras se midió el peso fresco (PF) y posteriormente se colocaron en estufa a 60 °C por 48 h para luego determinar en estas muestras el peso seco (PS). El parámetro utilizado para estimar la distribución de biomasa en las plántulas fue la relación vástago-raíz. Las determinaciones se realizaron tanto a partir de los valores de PF como de PS del órgano sin observarse diferencias significativas. Se procedió a expresar el total en

³⁰ Este valor de osmolalidad se encuentra por debajo del rango de calibración del osmómetro utilizado.

función de la relación medida a partir del PS y de esta forma evitar un efecto asociado a la cantidad de agua acumulada en cada uno de los órganos.

3.2. Tasa de crecimiento relativo del área foliar (TCR)

Las plantas en cultivo hidropónico fueron fotografiadas cada 2 horas desde el inicio del tratamiento hasta su finalización (48 h). La captura de imágenes con la cámara digital permitió determinar el área foliar (A) de las dos hojas en cada planta a lo largo del tiempo que duró ensayo. Se estimó el área foliar (A_i) a distintos tiempos a lo largo del crecimiento mediante el software libre provisto por NCBI, Image J, a partir de una imagen de 8 bits. Una hoja milimetrada de al menos 5 cm² como control interno se incorporó en cada una de las fotografías para poder expresar la medida en unidades de cm². Se tomó la precaución de mantener la misma distancia focal para las muestras vegetales como para el control interno, así como capturar la misma cara de la hoja. Para cada tiempo se determinó el área relativa respecto del área a tiempo 0 h (A_0) del ensayo como el A_i/A_0 . Se estimó la tasa de crecimiento del área foliar a partir de la pendiente de la recta obtenida en el gráfico de $\ln(A_i/A_0)$: $f(\text{tiempo})$, TCR.

3.3. Concentración de Na y K total en las plantas de remolacha

Los cationes fueron determinados por fotometría de llama (Metrolab M-315, Argentina) tanto en las hojas como en la raíz. La mineralización se realizó de acuerdo con los protocolos disponibles para tejidos vegetales (Sadzawka *et al.*, 2007). En primer lugar, se secó el tejido (48 h a 60 °C) y luego se mineralizó por calcinación en una mufla a 500°C por 1 h. Se procedió a calentar escalonadamente durante 2 h siguiendo el esquema 40 °C- 60 °C- 80 °C- 95 °C- 150 °C- 250 °C- 500 °C para minimizar proyecciones y la consiguiente pérdida de material. Las cenizas obtenidas se disolvieron en 1 mL 2 N de HCl acoplado a un proceso de sonicación de 10 min para favorecer la homogeneidad de la solución. Se añadió a cada crisol 4 mL de H₂O, y a partir de esta solución madre se realizaron las determinaciones de los iones. Se realizaron las determinaciones en el rango de respuesta lineal del equipo para ambos cationes, hasta 1 mM para el Na^+ y hasta 0.05 mM para el K^+ . La curva de calibración del equipo y su respuesta fue contrastada utilizando una batería de diluciones del estándar comercial de Roche "Standard ISE Low" (Na^+ 120 mM, K^+ 3 mM, Cl^- 80 mM).

3.4. Tasa transpiratoria (E)

El volumen de agua transpirada *por planta* se midió gravimétricamente. Un día antes de aplicar el tratamiento, cada planta se trasladó a un recipiente de plástico individual aireado, que se selló para evitar la evaporación de SH. Cada plántula en su recipiente

fue pesada cada hora entre las 9:00 am y 5:00 pm durante cuatro días consecutivos. En cada planta, el descenso del peso ($\Delta P = P_i - P_o$) en función del tiempo se utilizó para estimar la pérdida promedio de masa de agua por día y se la relativizó al área foliar para determinar la tasa transpiratoria ($E = \frac{\Delta P}{A \cdot t}$). Se corroboró que el cambio de peso a lo largo del día de un recipiente con el mismo volumen de solución, pero sin plantas no presentó una variación significativa de su peso a lo largo del día.

La determinación de la tasa transpiratoria se realizó en contenedores más pequeños que las macetas tradicionales, para poder trabajar con cada planta individualmente. En ellos se registró la disminución del peso total (que se asocia a la pérdida de agua a través de la parte aérea) a diferentes intervalos durante todo el experimento. Dado que este dispositivo fue diferente a las macetas utilizadas en los restantes ensayos, dos días antes de iniciado el tratamiento se transfirieron las plantas al nuevo sistema para evitar un efecto asociado al cambio de contenedor. El día del ensayo los contenedores fueron sellados para minimizar las pérdidas de agua por evaporación en la superficie y como control se registraron los cambios de peso en un contenedor sellado sin planta. Dado que no fue posible registrar variaciones significativas en este control consideramos al sistema apropiado para determinar el flujo de agua transpirado.

3.5. Tasa transpiratoria (E_2)

El volumen del agua por unidad de tiempo y por unidad de área que se transpira por hoja se determinó de acuerdo con los protocolos de la bibliografía (Sack & Scoffoni, 2012; Verslues *et al.*, 2006), y esta metodología fue utilizada en el capítulo 2 para determinar la tasa transpiratoria. Se remueve una hoja de la planta en condiciones controladas de temperatura, humedad e intensidad lumínica, y se registra la disminución del peso de la hoja a lo largo del tiempo en una balanza electrónica (± 0.00001 g). La pérdida de peso fresco en la hoja en función del tiempo se atribuye a la pérdida de agua. La curva se caracteriza por una primera fase rápida (30 minutos) y una segunda fase lenta. La primera fase se utilizó para determinar E_2 a partir de la pendiente del gráfico de disminución del peso fresco en función del tiempo. Luego este dato se relativizó por unidad de área.

3.6. Conductancia estomática (g_s)

La determinación de la conductancia estomática se realizó utilizando un porómetro de estado estacionario (SC-1, Decagon, Pullman, EE. UU). Todas las determinaciones se realizaron en modo automático (tiempo de medida 30 s) siguiendo las recomendaciones del manual. Aquellas determinaciones por fuera del

rango útil del modo automático del equipo se informaron como $< 5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (umbral de detección mínimo en este modo de lectura). Dado el tiempo que consume la estabilización de la cámara del porómetro como parte de la puesta a punto de las medidas se evaluó además si ambas hojas verdaderas presentaban el mismo perfil de g_s a lo largo del día (**Figura 36**). Como se puede apreciar de los datos obtenidos, las dos hojas verdaderas de cada planta presentaron el mismo perfil de respuesta a lo largo del día. Por ello, se procedió a medir una única hoja por plántula en los restantes experimentos siendo elegida la primera hoja verdadera madura completamente expandida.

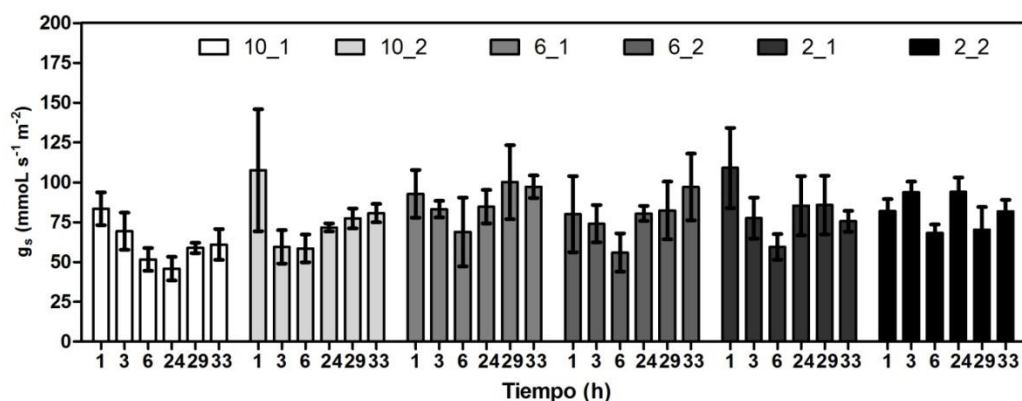


Figura 36: Evaluación de la conductancia estomática (g_s) en hojas de la misma planta a lo largo del día. Se determinó en las dos hojas verdaderas de las plantas de remolacha la conductancia estomática a lo largo del día. En este gráfico se presentan tres plantas independientes indicadas con los números 10, 6 y 2. Las plantas fueron nombradas con números naturales enteros para diferenciarlas entre sí. En cada una de las plantas se midió g_s en sus dos hojas, cada hoja se indicó con un guión y el número 1 o 2. Se observó que el comportamiento a lo largo del día para las dos hojas pertenecientes a la misma planta es similar. Las barras corresponden a la media de las lecturas \pm SD.

3.7. Contenido relativo de agua (CRA) y Contenido de Agua (CA)

Para evaluar este parámetro se cosechó, a los tiempos indicados, la primera hoja verdadera de las plantas cortándola a la altura del pecíolo, donde nace la lámina de la hoja. Para asegurar cortes limpios se utilizaron hojas de afeitar nuevas o de muy buen filo. De acuerdo con Kramer (1974), se calculó:

$$\text{CRA} = \frac{(\text{PF} - \text{PS})}{(\text{PT} - \text{PS})} * 100$$

Ecuación 17

Donde,

PF: peso fresco

PS: peso seco

PT: peso de máxima turgencia

El PF se obtuvo pesando las hojas inmediatamente después de haber sido cortadas. Luego las hojas fueron sumergidas en agua destilada durante 24 h para obtener el PT. Antes de pesarlas se eliminó el exceso de agua o gotas superficiales mediante papel absorbente. El PS del material se obtuvo secando las mismas hojas a 60 °C hasta que el mismo adquiriera un peso constante (48 h). A partir de estas mismas determinaciones se calculó el contenido de agua (CA) a partir de la relación (PF-PS)/PF.

3.8. Potencial hídrico de las hojas (Ψ'_h)

El potencial hídrico (Ψ'_h) en las hojas fue medido utilizando una cámara de presión o bomba de Scholander (Biocontrol modelo 4, Buenos Aires, Argentina) de acuerdo con protocolos previos (Turner, 1981). Antes de cosechar las hojas fueron cubiertas con film (Parafilm) por 20 minutos. El corte se realizó sobre el pecíolo a una distancia de ~1.5 cm del inicio de la lámina. Inmediatamente después del corte, se introdujo el pecíolo a través de la perforación de la tapa de la cámara y se procedió a realizar la medida. La presurización de la cámara fue realizada lentamente. Los tiempos de cosecha del material son los mismos, e incluyen un período de 40 min dada la manipulación y preparación para llevar a cabo las mediciones. Esto significa, por ejemplo, que los valores agrupados dentro de las 4 h están medidos entre 3.7 h y 4.3 h después del inicio del tratamiento (Bellati, 2012).

3.9. Potencial osmótico de las hojas (Ψ_{osm})

A partir del protocolo de congelado y descongelado descrito en la literatura (Mahdiah *et al.*, 2008; Katsuhara *et al.*, 2014), se determinó el potencial osmótico (Ψ_{osm}). En un recipiente plástico apto para centrífuga tipo Eppendorf® que cuenta con una criba en su interior, se colocó enrollada una hoja recién cosechada. El recipiente se congeló en N₂ líquido por 2-7 minutos -el tiempo que insume realizar la cosecha de todas las muestras de un ensayo tipo. Se descongeló a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 4000 g durante 4 min a 4 °C. El exudado obtenido en el fondo del recipiente, desprovisto de tejido dada la presencia de la criba, se utilizó para estimar el potencial osmótico de la hoja ($\Psi_{osm} = -\pi$) a través de la determinación de la osmolalidad (π) en un osmómetro de presión de vapor (VAPRO 5520, Wescor, Logan, UT, EE.UU.).

3.10. Potencial de presión turgente de las hojas (Ψ_p)

El potencial de presión turgente forma parte de los componentes que contribuyen al potencial hídrico en un sistema celular. Dado que $\Psi_h = \Psi_p + \Psi_\pi + \Psi_g$, (Nobel *et*

al., 2009) siendo despreciable en nuestro sistema experimental el potencial gravitatorio (Ψ_g), Ψ_p fue calculado a partir de los restantes términos.

3.11. Conductividad hidráulica en raíces (L_{pr})

La determinación de la conductividad hidráulica de la raíz (L_{pr}) se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente (Javot *et al.*, 2003) al que se le introdujo una modificación en cuanto a la normalización de los datos. En este caso, los valores de L_{pr} fueron normalizados al peso seco de la raíz (PS raíz) en lugar del área. En la literatura se propone que este parámetro normalizado por unidad de peso seco está en relación directa con el costo de redistribución de carbono por parte de la planta (Tyree, 2003). Esta modificación es compatible con otros reportes presentes en la bibliografía (Boursiac *et al.*, 2005; Calvo-Polanco, Sánchez-Romera & Aroca, 2014; T. Henzler *et al.*, 1999). En estos experimentos, la raíz completa de una planta recién despojada de su parte aérea se insertó en un tubo de 50 mL lleno de SH ubicado en el interior de la cámara de presión (BioControl, Modelo 2, Argentina). Se procedió de acuerdo con lo desarrollado por Bellati (Tesis Doctoral, FFYB, 2012). Brevemente, el hipocotilo se conectó cuidadosamente a un tubo capilar de vidrio que luego se pasa a través de la tapa metálica de la cámara. Utilizando pasta dental de baja viscosidad (A + silicona, Densell) se garantiza el cierre total de la cámara para evitar la pérdida del gas nitrógeno (N_2) que es inyectado por presión durante la medición. El tubo capilar cuenta con una escala graduada adosada que permite determinar el volumen de savia conducido por la raíz y así poder calcular el correspondiente flujo (J_v). Una vez preparado el sistema, se presurizó la cámara con N_2 y se calculó para cada presión (ΔP), el flujo (J_v) de savia resultante (5 -15 min a diferentes presiones $P= 0.3$, 0.4 y 0.2 MPa- respetando ese orden). A partir de la recta que relaciona J_v con la Presión, se obtuvo la pendiente que permitió calcular la conductividad hidráulica (L_{pr}) normalizada por el PS de la raíz (**Figura 37**). La abscisa al origen (P_0) se obtuvo a partir del ajuste a la función lineal para estimar el potencial osmótico entre los vasos y la SH (Boursiac *et al.*, 2005). Se verificó que en los períodos de medida el flujo de exudado fuera constante.

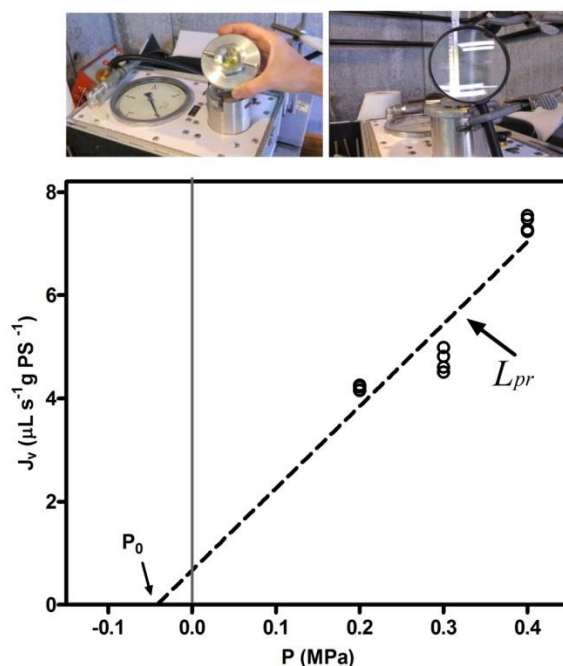


Figura 37: Determinación de la conductividad hidráulica de la raíz (L_{pr}). Se utilizó la cámara de Scholander que se muestra en las fotografías superiores para determinar L_{pr} . Este dispositivo cuenta con un tanque de N_2 , con el que se incrementa la presión externa en el entorno de la raíz que se encuentra dentro de la cámara. A partir de un capilar graduado se determinó el flujo (J_v) asociado a la presión realizada. Los valores de flujo fueron normalizados por unidad de peso seco de la raíz (PS). En el gráfico se visualiza la pendiente de la recta obtenida (línea de puntos) del ajuste de $J_v: f(P)$ es L_{pr} , y la abscisa al origen, el P_0 . Para cada planta medida, se toman entre 3-4 lecturas de J_v a cada presión, y se miden tres presiones distintas.

3.11.1. Evaluación del efecto de los inhibidores de la vía celular en L_{pr} .

Se analizó el efecto de dos inhibidores del flujo de agua a través de la vía celular, $HgCl_2$ (50 μM) y ácido propiónico (20 mM). El mecanismo propuesto en la literatura para cada uno es diferente si bien ambos son reversibles. En particular el $HgCl_2$ ha sido el más popular usado en este sentido (Tournaire-Roux *et al.*, 2003), y se adjudica su efecto a la oxidación sobre los grupos sulfhidrilo de las acuaporinas (Kuwahara *et al.*, 1997; Mulders *et al.*, 1997; Savage & Stroud., 2007). Los compuestos mercuriales, aunque conocidos por sus propiedades tóxicas, fueron los primeros inhibidores descritos para la permeabilidad al agua mediada por acuaporinas en la literatura (revisado en To & Torres 2015). Estudios previos siguen convalidando que el uso de $HgCl_2$ en concentraciones inferiores a 200 μM involucraría mínimos efectos secundarios (Sadok & Sinclair, 2010). El ácido propiónico también promueve la inhibición del pasaje de agua por la vía celular porque promueve una acidificación localizada de la raíz y la consiguiente inhibición del pasaje de agua mediado putativamente por acuaporinas que presentan histidinas que afectan el gatillado (*gating*) del canal (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Ehlert *et al.*, 2009).

Se evaluó el efecto de estos agentes sobre el flujo (J_v) que conduce la raíz a 0.3 MPa en la cámara de Scholander. El procedimiento requirió:

- I. determinar el J_v a presión constante
- II. añadir el inhibidor
- III. determinar el J_v en presencia del inhibidor (no más de 20 min³¹) a presión constante

Se deduce que es necesario abrir y volver a cerrar la cámara de Scholander en el medio del protocolo, y por lo tanto presurizar la raíz en dos oportunidades consecutivas. Por ello se incorporó como control de la metodología evaluar el efecto de la apertura y cierre de la cámara en la medida del J_v en ausencia del inhibidor.

3.12. Conductividad osmótica en raíces (L_{po})

Se estima que cuando se suspende la tensión generada por el flujo transpiratorio en las plantas, el flujo exudado espontáneo en las raíces se atribuye a la conductividad osmótica mediada por la vía celular (Henzler *et al.* 1999; Gambetta *et al.* 2013; Calvo-Polanco *et al.* 2014). En colaboración con el Laboratorio dirigido por el Dr. Ricardo Aroca (Estación Experimental Zaidin, Granada, España), se realizó la determinación del flujo exudado libre de acuerdo con los protocolos descritos en la literatura. Brevemente, las plántulas se cortan por debajo de los cotiledones y los exudados son recogidos en un tubo tipo Eppendorf® que fuera previamente pesado conteniendo una torunda de algodón ($P1$). El corte del vástago supone cortar el continuo de flujo, por lo tanto la raíz ya no se encuentra sujeta al gradiente hidrostático ligado a la demanda transpiratoria de la parte aérea (Miyamoto *et al.*, 2001). Esto hace se retraiga la savia en el interior de los vasos. En *Beta vulgaris*, el tiempo de exudado fue de 3 h para poder recolectar un flujo mensurable. Luego de transcurridas las 3h se determinó el peso final del Eppendorf en el que se recolectó el flujo ($P2$) y posteriormente el peso seco de la raíz (PS) correspondiente a cada plántula. A partir de la diferencia entre $P1$ y $P2$ (ΔP) se determinó la masa de exudado total. Esto permite calcular L_{po} según,

$$L_{po} = \frac{\Delta P}{t} * \frac{1}{PS * R * T * \Delta \Psi}$$

Ecuación 18

t: tiempo de colección de exudado; *R*: constante de los gases ideales; *T*: temperatura absoluta; $\Delta \Psi$: diferencia de potencial osmótico entre el exudado obtenido y la solución de nutrientes (SH) en que están las plantas

³¹ Se probaron diferentes tiempos de incubación (5, 10, 15 y 20 minutos) hasta encontrar el efecto. En la discusión de los resultados se discute la respuesta medida en estas condiciones.

3.12.1. Efecto de la cicloheximida (CHX) en la conductividad osmótica de la raíz.

La cicloheximida (CHX) es un inhibidor de síntesis de novo que ha sido utilizado para el estudio del transporte de agua con anterioridad (Moshelion *et al.* 2002; Voicu & Zwiazek 2004; Sadok & Sinclair 2010). Se disolvió CHX a una concentración 1 mM en solución acuosa estéril de agua bidestilada con 0.05 % V/V de DMSO (Cochard *et al.*, 2007). A partir de esta solución madre concentrada se realizaron diluciones para probar diferentes concentraciones del inhibidor. Inicialmente, en plantas control se probaron las concentraciones de 10 µM y 100 µM para determinar el tiempo durante el que realizar el tratamiento. Después de 2 h de tratamiento se observó una reducción del flujo exudado libre de la raíz. Se decidió utilizar una concentración de 1 µM por el período de 4 h durante el que se aplicó los diferentes tratamientos.

3.13. Determinación de la contribución de la vía apoplástica

La contribución de la vía apoplástica al flujo de agua transportado por la raíz se realizó utilizando el colorante Light Green SF Yellowish o Acid green 5 (Sigma Aldrich Chemical), que presenta la característica de no ingresar a la vía celular (simplasto) por lo cual su distribución en el interior del órgano queda restringida al apoplasto (Epel & Bandurski, 1990). Las raíces de las plántulas una vez cosechadas fueron incubadas en la solución colorante (210 µM) durante 15 min (Lopez-Perez *et al.*, 2007). Luego las raíces fueron montadas dentro de la cámara de Scholander, se mantuvieron durante 15 min a una presión de 0.3 MPa lo que permitió colectar el flujo exudado utilizando la misma estrategia que en el caso de las determinaciones de conductividad osmótica detallada en L_{po} . Inmediatamente después de finalizada la recolección, se determinó la concentración del colorante a 630 nm utilizando un espectrofotómetro de volúmenes mínimos (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer). El porcentaje de flujo conducido por la vía del apoplasto se calculó a partir de la relación entre la absorbancia de la fracción colectada respecto a la absorbancia de la solución en la que se incubaron las raíces. La relación de absorbancias (Abs) es directamente proporcional a la relación de concentración del soluto (C) entre la solución de incubación y la solución exudada.

$$\frac{Abs_{exudado}}{Abs_{externa}} = \frac{C_{exudado}}{C_{externa}}$$

Ecuación 19

La máxima concentración corresponde a la $C_{externa}$, puesto que al ingresar al órgano experimenta una dilución como consecuencia de la parte del flujo que no proviene

del apoplasto. Por lo tanto, si el flujo exudado presentara la misma concentración que la solución de incubación es posible suponer que todo el exudado corresponde a flujo del apoplasto. En todas las determinaciones se midió también la absorbancia del exudado a 530 nm, y se verificó que no existiera solapamiento entre los picos, por la posible interferencia de las betalaínas de la remolacha (Kujala *et al.*, 2001).

3.14. Suberización en las raíces

Se realizaron cortes en fresco del tejido para evaluar cualitativamente cambios en la deposición de suberina o suberización. Las raíces frescas de las plántulas se cortaron en secciones de 10 mm de longitud y se incubaron en 0.3% P/V del colorante Sudan red IV (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol 70% (V/V) durante 1 h (Sutka *et al.* 2011). Luego, los fragmentos de raíces se enjuagaron en agua destilada y fueron finamente cortados en forma transversal usando una hoja de afeitar. Las muestras se montaron en portaobjetos con glicerol y se observaron con un microscopio con una cámara fotográfica acoplada (Zeiss Axioskop 2, Japón). La deposición de suberina en la endodermis está asociada a la maduración y diferenciación del tejido a lo largo de la raíz. Después de la zona de crecimiento de la raíz se presenta una zona de elongación donde se evaluó la deposición de suberina. En las raíces de *Beta vulgaris* cultivadas en el sistema de hidroponía descrito se realizaron los cortes a 10 cm del meristema apical.

4. Protocolo utilizado en el modelado del cambio de volumen del tonoplasto

4.1. Material vegetal empleado para el aislamiento de vacuolas de la raíz almacenadora de remolacha roja

Las remolachas (*Beta vulgaris* L.) fueron adquiridas comercialmente y se trasplantaron a pots con suelo fértil comercial para conservarlas dentro del laboratorio hasta su utilización (nunca superior a tres semanas de adquiridas). Las raíces de estas plantas presentan acumulación de betalaínas³² en las vacuolas del parénquima, lo que hace que si se aíslan vacuolas del parénquima, las mismas sean fácilmente identificables para su estudio por video-microscopía (Azeredo, 2009; Nandini *et al.*, 2013).

³² Las betalaínas son metabolitos secundarios nitrogenados de las plantas que actúan como pigmentos, pueden ser de tonos rojos o amarillos.

4.2. Aislamiento de vacuolas de parénquima de raíces de remolacha

Las vacuolas se aislaron mecánicamente de acuerdo al método de Leigh & Branton (1976) donde las raíces son cortadas en secciones de 1 cm³ e incubadas durante 20 min en una solución 2 M sacarosa. Posteriormente, el exceso de solución se elimina con un papel absorbente, y las secciones de tejido son transferidas a una solución iso-osmótica (400 mM manitol, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-Mes, pH 7.6, 450 mOsm Kg_{H2O}⁻¹) y en esta misma solución se produce el aislamiento que se produce cortando estas secciones de tejido finamente con un bisturí nuevo u hoja de afeitar tipo Gillette®, lo que facilita la liberación de las vacuolas al medio. El aislamiento se realiza el mismo día del experimento y las vacuolas obtenidas se mantienen en la solución ISO (**Tabla 8**) a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) por no más de 2 h. Dado el protocolo de aislamiento, se considera que las vacuolas alcanzan un nuevo estado estacionario luego del tratamiento con sacarosa 2 M. Las sustancias que componen la solución ISO como las soluciones HIPO e HIPER se consideran impermeables al tonoplasto lo que permite mantener tanto el agente osmótico como el pH del medio externo. Se considera que al comenzar el ensayo el pH en el interior vacuolar es el mismo que en el medio externo y que el potencial osmótico es igual a la del medio externo.

4.3. Ensayos de perfusión para determinar el cambio de volumen

Se llevaron a cabo experimentos de perfusión como se describe en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Amodeo *et al.*, 2002). Una alícuota (50 µL) de la solución que contiene vacuolas se transfirió a una pequeña cámara diseñada *ad hoc* (V_f: 400 µL) cuyo fondo es un portaobjeto circular intercambiable que permite visualizar las vacuolas a través de un microscopio invertido. La cámara cuenta con un sistema de perfusión que permite intercambiar la solución (caudal: 521 ± 39 µL min⁻¹) mientras la vacuola es registrada digitalmente mediante una computadora incorporada al microscopio invertido Olympus IMT-2 (Sutka, 2005). Inicialmente, las vacuolas se perfundieron³³ con una solución iso-osmótica durante 300 s, que luego fue sustituida por una solución hipo-osmótica o por una solución hiper-osmótica, preparadas de acuerdo a como se indica en la siguiente **Tabla**.

³³ Si bien el término correcto es superfusión dado que la perfusión se especifica cuando es el interior de un tejido u órgano el que recibe una solución externa, aquí emplearemos la palabra perfusión como simplificación.

Tabla 8: Composición de las soluciones utilizadas en los ensayos de perfusión. Se indica la concentración en mM. La modificación de la osmolalidad proviene exclusivamente de la cantidad de un soluto no cargado de alto peso molecular (manitol) en la solución garantizando de esta forma que el gradiente impuesto a través del tonoplasto no pueda atribuirse a una variación de otro de los componentes del medio. El tampón seleccionado no permea a través de la membrana en estudio. Tanto el protocolo de extracción como el medio donde se liberan las vacuolas carecen de solutos cargados (iones).

Solución	Composición (mM)		
	Iso-osmótica (ISO)	Hipo-osmótica (HIPO)	Hiper-osmótica (HIPER)
Manitol	400	200	600
EDTA	1	1	1
Tris-MES	20	20	20
Osm (mOsm Kg ⁻¹ H ₂ O)	450	250	650

4.4. Video-microscopía

La evolución temporal de la variación del volumen de una vacuola aislada seleccionada en la cámara de perfusión fue registrada a partir de fotografías adquiridas con una cámara digital (Electrim EDC-1000, EBSCO, EEUU) incorporada al microscopio. Las imágenes de la vacuola se registraron cada 30 s durante 10 min después de cambiar la solución de perfusión. El diámetro de la vacuola se midió a partir de las imágenes almacenadas empleando el software comercial (AMCaP version 9.20, <http://noeld.com/programs.asp?cat=video#AMCap>); y se empleó un portaobjetos comercial con regla micrométrica para convertir la longitud medida en pixeles a unidades métricas del SIMELA.

4.5. Determinación de la osmolalidad del medio externo durante la perfusión

Se realizaron experimentos donde se determinó el curso temporal de la osmolalidad externa en los ensayos de perfusión con medio hipo-osmótico. Desde el inicio del experimento, se tomaron alícuotas de 20 µL de la solución cada 30 s para determinar la osmolalidad en un osmómetro de presión de vapor (VAPRO 5520, Wescor, Logan, UT). La función que mejor ajustó el cambio de osmolalidad en función del tiempo fue una exponencial simple, **Figura 27**. Esta función fue incorporada a la rutina de ajuste de los modelos, utilizando el valor medio obtenido para los parámetros de la función.

4.6. Modelo de ajuste dependiente de los datos experimentales

La cinética de cambio de volumen de las vacuolas se simuló mediante la implementación de los modelos descritos en la sección de resultados. Se aplicó una rutina codificada en Visual Basic. A partir de la colaboración con el Dr. Marcelo Ozu

(IFIBIO–Houssay CONICET, FMED-UBA) y el Dr. Osvaldo Chara (IFLISYB-CONICET, UNLP) se construyeron las rutinas de acuerdo con las suposiciones que determinan cada uno de los modelos propuestos. Esta rutina resuelve las ecuaciones diferenciales del modelo numérico y está vinculada a la rutina de ajuste codificado en el mismo lenguaje de programación. En todos los casos, en el programa se cargan los datos experimentales del volumen relativo (V_i/V_o) de la vacuola en el tiempo, el volumen inicial de la vacuola y su superficie. Las ecuaciones diferenciales que gobiernan cada modelo se integraron numéricamente empleando el método de Euler. Se utilizó un paso de integración de 0.1 s, que garantiza la estabilidad del método numérico.

Algebraicamente, el ajuste consistió en explorar el espacio de parámetros hasta minimizar una función dada de ajuste; en cada caso, la del modelo a simular. Este modo de ajuste barre todo el espacio de parámetros hasta obtener los coeficientes de la función que minimiza la suma de los residuos, R. Aquí R, la diferencia entre el volumen experimental de la vacuola aislada y los valores simulados por el modelo en estudio en cada tiempo experimental, presenta un valor menor en la medida en que sea inferior la diferencia entre los valores experimentales y los simulados. Para elegir entre los modelos se aplicó el criterio de Akaike (Akaike, 1974). Este se calculó como $AIC=n \cdot \ln(S) + 2P$, donde n es el número de datos, S la suma de residuos al cuadrado y P el número de parámetros ajustados por el modelo. Se seleccionó el modelo con el menor valor AIC.

Anexo

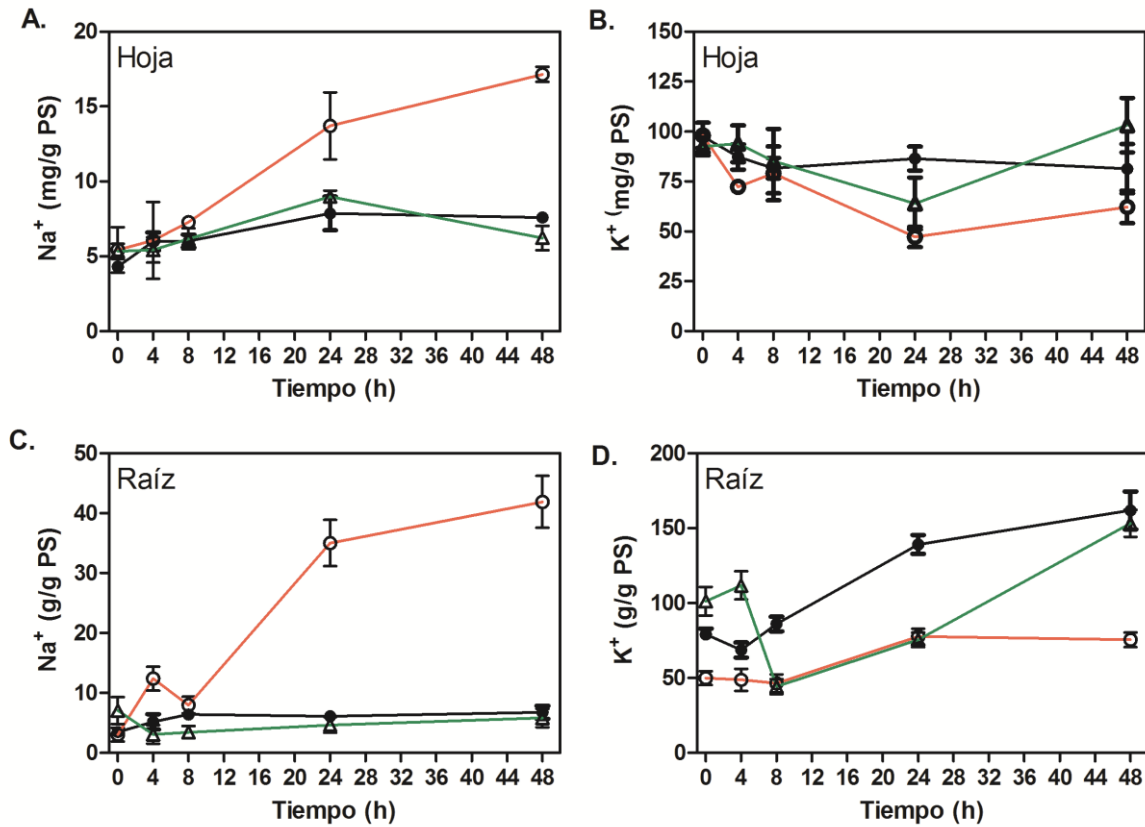


Figura 38: Concentración total de Na^+ y K^+ a lo largo del tratamiento. Se presenta la masa de los iones determinada por emisión atómica y relativizada por unidad de peso seco (PS) del órgano en estudio. **A y C**, concentración de Na^+ en la hoja y raíz respectivamente; **B y D**, concentración de K^+ en la hoja y raíz respectivamente. Los círculos negros con línea negra: plantas en SH; círculos abiertos con línea colorada: plantas en SH+NaCl; triángulos abierto con línea verde: plantas en SH+KCl. Se representa el tiempo desde el inicio del tratamiento, t:0h es el momento en que se adicionaron las sales al medio.

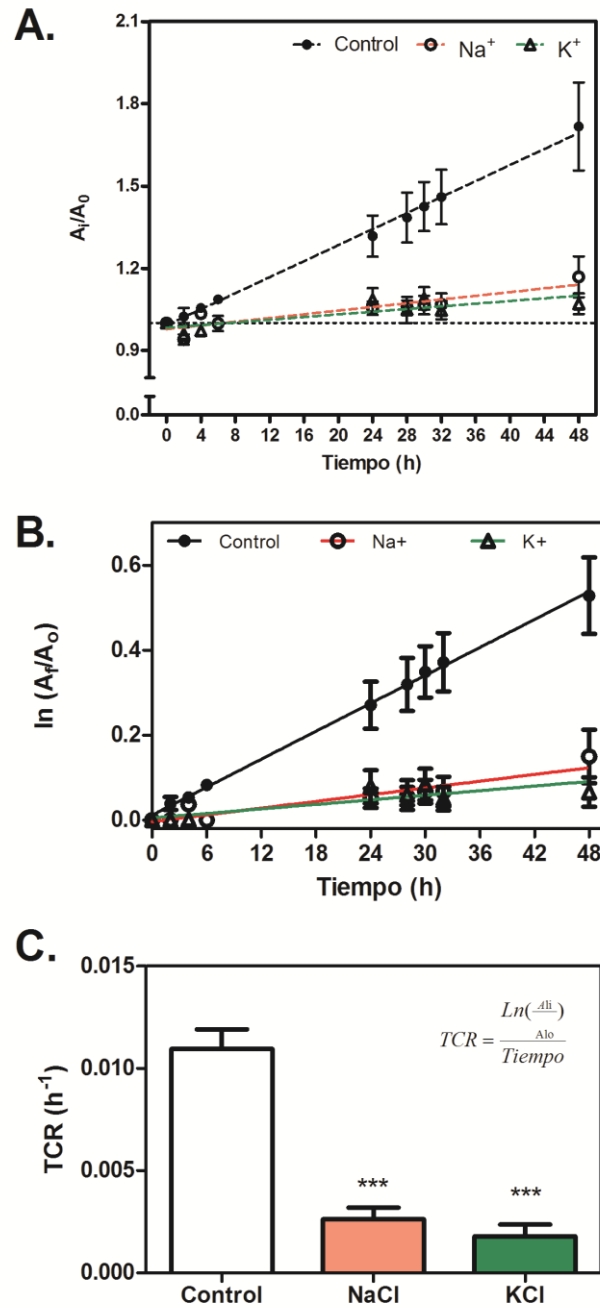


Figura 39: Determinación del efecto del tratamiento salino en el crecimiento relativo foliar. **A.** El área foliar relativa (A_i/A_0) de las plantas en el sistema hidropónico a lo largo del tiempo. En cada una de las plantas, ambas hojas fueron fotografiadas a lo largo del día. A partir de las imágenes digitales se determinó el área foliar y se calculó el área foliar relativa por comparación con respecto al área al iniciar el tratamiento en cada planta (A_0). Todas las fotografías fueron realizadas con el mismo aumento y distancia focal. **B.** $\ln(A_i/A_0)$ en función del tiempo. Se observó que el tratamiento redujo marcadamente el desarrollo foliar tanto en las plantas tratadas con NaCl como las tratadas con KCl. **C.** La tasa de crecimiento relativo (TCR) se estimó a partir de la pendiente del gráfico de $\ln(A_i/A_0)$ en función del tiempo, como se indica en la fotografía. *** $p < 0.01$, t-test. n:5.

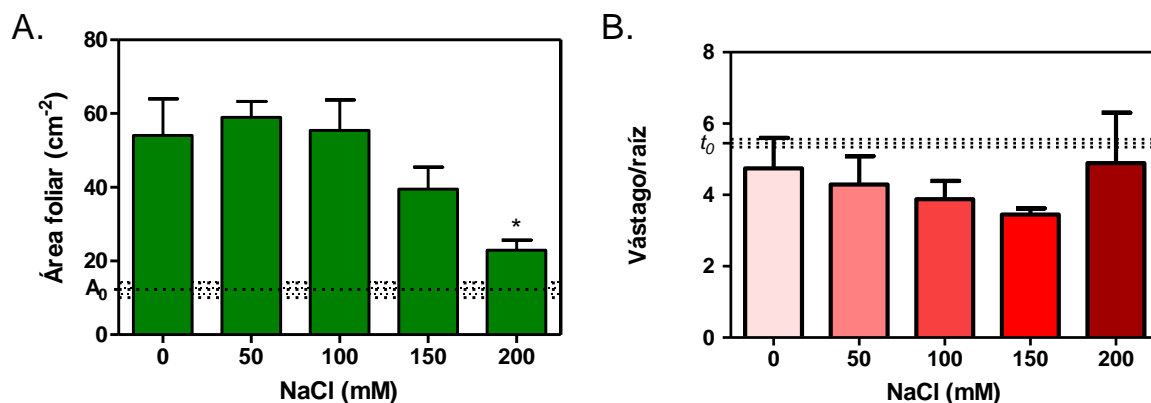


Figura 40: Efecto del tratamiento salino sobre el desarrollo de las plantas después de 8 días en el mismo. En el largo plazo se observó el efecto de la salinidad en las plantas a partir de los 8 días de tratamiento. **A.** Área foliar de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos salinos durante 8 días. El área promedio inicial (A_0) de la población de plantas utilizadas fue indicada en línea de puntos, media \pm SEM. Si bien el tratamiento con 150 mM de NaCl induce una reducción en el área foliar, este parámetro es significativamente distinto en las plantas tratadas con 200 mM ($p < 0.05$, Bonferroni test, Anova de un factor). **B.** La relación vástago raíz no presentó diferencias significativas entre las plantas tratadas y las plantas en SH. Es posible observar en el gráfico que en todos los casos existe una tendencia a disminuir la relación entre vástago y raíz respecto del valor inicial presentado al inicio del tratamiento t_0). Se presentan los datos como la media \pm SEM.

Bibliografía

- Abbas, F., Mohanna, A. and Al-lahham, G. (2012) 'Osmotic Adjustment in Sugar Beet Plant under Salinity Stress', *Journal of Sugar Beet*, 28(1), pp. 37–43.
- Akaike, H. (1974) 'A New Look at the Statistical Model Identification', *Automatic Control, IEEE Transactions on*, 19(6), pp. 716–723. doi: 10.1109/TAC.1974.1100705.
- Alexander, J. (1971) 'Factors affecting quality', in Johnson, R. T., Alexander, J. ., Rush, G. ., and Hawkes, G. . (eds) *Advances In Sugar Beet Production: Principles and Practices*. Ames, IA: Iowa State University Press, pp. 371–382.
- Alexandersson, E., Frayse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U. and Kjellbom, P. (2005) 'Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins.', *Plant molecular biology*, 59(3), pp. 469–84. doi: 10.1007/s11103-005-0352-1.
- Alexandre, J. and Lassalles, J.-P. (1991) 'Hydrostatic and osmotic pressure activated channel in plant vacuole', *Biophysical Journal*, 60(6), pp. 1326–1336. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82170-1.
- Alleva, K., Chara, O. and Amodeo, G. (2012) 'Aquaporins: Another piece in the osmotic puzzle', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 586(19), pp. 2991–2999. doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.013.
- Alleva, K., Niemietz, C. M., Sutka, M., Maurel, C., Parisi, M., Tyerman, S. D. and Amodeo, G. (2006) 'Plasma membrane of Beta vulgaris storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations.', *Journal of experimental botany*, 57(3), pp. 609–21. doi: 10.1093/jxb/erj046.
- Amodeo, G., Dorr, R. A., Amodeo, G., Dorr, R., Vallejo, A., Sutka, M. and Parisi, M. (1999) 'Radial and axial water transport in the sugar beet storage root Radial and axial water transport in the sugar beet storage root', 50(January 2016), pp. 509–516.
- Amodeo, G., Sutka, M., Dorr, R. and Parisi, M. (2002) 'Protoplasmic pH modifies water and solute transfer in Beta vulgaris root vacuoles', *Journal of Membrane Biology*, 187(3), pp. 175–184. doi: 10.1007/s00232-001-0162-6.
- Aroca, R., Porcel, R. and Ruiz-Lozano, J. M. (2012) 'Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions', *Journal of Experimental Botany*, 63(1), pp. 43–57. doi: 10.1093/jxb/err266.
- Ashraf, M. and Grignon, C. (2008) *Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance*. Edited by C. Abdelly, M. Öztürk, M. Ashraf, and C. Grignon. Basel: Birkhäuser Basel. doi: 10.1007/978-3-7643-8554-5.
- Azaizah, H. and Steudle, E. (1991) 'Effects of Salinity on Water Transport of Excised Maize (Zea mays L.) Roots.', *Plant physiology*, 97(3), pp. 1136–45. doi: 10.1104/pp.97.3.1136.
- Azeredo, H. M. C. (2009) 'Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review', *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), pp. 2365–2376. doi: 10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x.
- Barone, L. M., He Mu, H., Shih, C. J., Kashlan, K. B. and Wasserman, B. P. (1998) 'Distinct Biochemical and Topological Properties of the 31- and 27-Kilodalton Plasma Membrane Intrinsic Protein Subgroups from Red Beet1', *Plant Physiology*. American Society of Plant Physiologists, 118(1), pp. 315–322.

- Barone, L. M., Shih, C. and Wasserman, B. P. (1997) 'Mercury-Induced Conformational-Changes and Identification of Conserved Surface Loops in Plasma-Membrane Aquaporins from Higher-Plants - Topology of Pmp31 from Beta-Vulgaris L', *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), pp. 30672–30677.
- Bartels, D. and Dinakar, C. (2013) 'Balancing salinity stress responses in halophytes and non-halophytes : a comparison between *Thellungiella* and *Arabidopsis thaliana*', *Functional Plant Biology*, 40, pp. 819–831. doi: 10.1071/FP12299.
- Beauzamy, L., Nakayama, N. and Boudaoud, A. (2014) 'Flowers under pressure: Ins and outs of turgor regulation in development', *Annals of Botany*, 114(7), pp. 1517–1533. doi: 10.1093/aob/mcu187.
- Bell, C. and Leigh, R. (1996) 'Differential effects of turgor on sucrose and potassium transport at the tonoplast and plasma membrane of sugar beet storage root tissue', *Plant Cell and Environment*, 19, pp. 191–200.
- Bellati, J. (2012) Tesis de Doctorado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Bellati, J., Alleva, K., Soto, G., Vitali, V., Jozefkowicz, C. and Amodeo, G. (2010) 'Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin co-expression.', *Plant molecular biology*, 74(1–2), pp. 105–18. doi: 10.1007/s11103-010-9658-8.
- Boursiac, Y., Boudet, J., Postaire, O., Luu, D.-T., Tournaire-Roux, C. and Maurel, C. (2008) 'Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization.', *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 56(2), pp. 207–18. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03594.x.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.-T., Sorieul, M., Van Den Dries, N., Maurel, C., Dries, N. Van Den and Maurel, C. (2005) 'Early Effects of Salinity on Water Transport in *Arabidopsis* Roots . Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression 1', *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, 139(10), pp. 790–805. doi: 10.1104/pp.105.065029.water.
- Boyer, J. S., James, R. a., Munns, R., Condon, T., Passioura, J. B. (2008) 'Osmotic adjustment leads to anomalously low estimates of relative water content in wheat and barley', *Functional Plant Biology*, 35(11), pp. 1172–1182. doi: 10.1071/FP08157.
- Bramley, H., Turner, N. C., Turner, D. W. and Tyerman, S. D. (2009) 'Roles of morphology, anatomy, and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots.', *Plant Physiol.*, 150(1), pp. 348–364. doi: 10.1104/pp.108.134098.
- Buckley, T. N. (2005) 'The control of stomata by water balance', *New Phytologist*, 168(2), pp. 275–292. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01543.x.
- Caldeira, C. F., Bosio, M., Parent, B., Jeanguenin, L., Chaumont, F., & Tardieu, F. (2014). 'A Hydraulic Model Is Compatible with Rapid Changes in Leaf Elongation under Fluctuating Evaporative Demand and Soil Water Status'. *Plant Physiology*, 164(4), 1718–1730. <http://doi.org/10.1104/pp.113.228379>
- Calvo-Polanco, M., Sánchez-Romera, B. and Aroca, R. (2014) 'Mild salt stress conditions induce different responses in root hydraulic conductivity of *phaseolus vulgaris* over-time.', *PloS one*, 9(3), p. e90631. doi: 10.1371/journal.pone.0090631.
- Carvajal, M., Martinez, V. and Alcaraz, C. F. (1999) 'Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper', *Physiologia Plantarum*, 105(1), pp. 95–101. doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.105115.x.
- Casado-Vela, J., Muries, B., Carvajal, M., Iloro, I., Elortza, F. and Martínez-Ballesta, M. C. (2010) 'Analysis of Root Plasma Membrane Aquaporins from *Brassica oleracea* : Post-

Translational Modifications , de novo Sequencing and Detection of Isoforms by High Resolution Mass Spectrometry', *Journal of Proteome Research*, pp. 3479–3494.

- Casson, S. A. and Hetherington, A. M. (2010) 'Environmental regulation of stomatal development', *Current Opinion in Plant Biology*, 13(1), pp. 90–95. doi: 10.1016/j.pbi.2009.08.005.
- Chaumont, F. and Tyerman, S. D. (2014) 'Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations.', *Plant physiology*, 164(4), pp.1600-18. doi: 10.1104/pp.113.233791.
- Choudhary, S., Sinclair, T. R. and Prasad, P. V. V. (2013) 'Hydraulic conductance of intact plants of two contrasting sorghum lines, SC15 and SC1205', *Functional Plant Biology*, 40(7), pp. 730–738. doi: 10.1071/FP12338.
- Chrispeels, M. J. and Maurel, C. (1994) 'Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells?', *Plant physiology*, 105(1), pp. 9–13. doi: 10.1104/pp.105.1.9.
- Claeys, H., Landeghem, V., Dubois, M., Maleux, K., Inzé, D., Van Landeghem, S., Dubois, M., Maleux, K. and Inzé, D. (2014) 'What is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used In Vitro Stress Assays.', *Plant physiology*, 165(6), pp. 519–527. doi: 10.1104/pp.113.234641.
- Clarke, N. A., Hetschkun, H. M., Jones, C., Boswell, E., Marfaing, H. (1993) 'Identification of Stress Tolerance Traits in Sugar Beet. In: Jackson M.B., Black C.R. (eds) Interacting Stresses on Plants in a Changing Climate. pp. 521–524.
- Cochard, H., Venisse, J.-S., Barigah, T. S., Brunel, N., Herbette, S., Guilliot, A., Tyree, M. T. and Sakr, S. (2007) 'Putative Role of Aquaporins in Variable Hydraulic Conductance of Leaves in Response to Light', *Plant Physiology*, 143(1), pp. 122–133. doi: 10.1104/pp.106.090092.
- Cosgrove, D. and Steudle, E. (1981) 'Water relations of growing pea epicotyl segments', *Planta*, 153(4), pp. 343–350. doi: 10.1007/BF00384253.
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J. and Hirt, H. (2014) 'The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 32(1), pp. 40–52. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.006.
- Daoud, S., Harrouni, M. C. and Bengueddour, R. (2001) 'Biomass production and ion composition of some halophytes irrigated with different seawater dilutions', First international conference on saltwater intrusion and coastal aquifers, pp. 23-25.
- Dewar, R. C. (2002) 'The Ball-Berry-Leuning and Tardieu-Davies stomatal models: synthesis and extension within a spatially aggregated picture of guard cell function', *Plant, Cell and Environment*. Blackwell Science, Ltd, 25(11), pp. 1383–1398. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00909.x.
- Diekmann, W., Hedrich, R., Raschke, K. and Robinson, D. G. (1993) 'Osmocytosis and vacuolar fragmentation in guard cell protoplasts: their relevance to osmotically-induced volume changes in guard cells', *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press, 44(10), pp. 1569–1577. doi: 10.1093/jxb/44.10.1569.
- Dohm, J. C., Minoche, A. E., Holtgräwe, D., Capella-Gutiérrez, S., Zakrzewski, F., Tafer, H., Rupp, O., Sörensen, T. R., Stracke, R., Reinhardt, R., Goesmann, A., Kraft, T., Schulz, B., Stadler, P. F., Schmidt, T., Gabaldón, T., Lehrach, H., Weisshaar, B. and Himmelbauer, H. (2013) 'The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*).', *Nature*. doi: 10.1038/nature12817.
- Draycott, A. P. (2006) *Sugar Beet, Plant Molecular Biology*. Edited by A. J. Burn, T. H. Coaker, and P. C. Jepson. Academic Press. doi: 10.1002/9780470751114.

- Draye, X., Kim, Y., Lobet, G. and Javaux, M. (2010) 'Model-assisted integration of physiological and environmental constraints affecting the dynamic and spatial patterns of root water uptake from soils', *Journal of Experimental Botany*, 61(8), pp. 2145–2155. doi: 10.1093/jxb/erq077.
- Ehlert, C., Maurel, C., Tardieu, F. and Simonneau, T. (2009) 'Aquaporin-mediated reduction in maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transpiration.', *Plant physiology*, 150(2), pp. 1093–104. doi: 10.1104/pp.108.131458.
- Ehwald, R., Kowallick, D., Meshcheryakov, A. B. and Kholodova, V. P. (1980) 'Sucrose Leakage from Isolated Parenchyma of Sugar Beet Roots', *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press, 31(2), pp. 607–620. doi: 10.1093/jxb/31.2.607.
- Enstone, D. E. and Peterson, C. A. (1997) 'Suberin deposition and band plasmolysis in the corn (*Zea mays* L.) root exodermis', *Canadian Journal of Botany*. NRC Research Press Ottawa, Canada, 75(7), pp. 1188–1199. doi: 10.1139/b97-832.
- Enstone, D. E. and Peterson, C. A. (1998) 'Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots', *Plant, Cell and Environment*. Blackwell Science Ltd, 21(8), pp. 837–844. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00310.x.
- Enstone, D. E., Peterson, C. a. and Ma, F. (2002) 'Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment', *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), pp. 335–351. doi: 10.1007/s00344-003-0002-2.
- Epel, B. L. and Bandurski, R. S. (1990) 'Apoplastic domains and sub-domains in the shoots of etiolated corn seedlings', *Physiologia Plantarum*. Blackwell Publishing Ltd, 79(4), pp. 599–603. doi: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb00031.x.
- Farquhar, G. D. and Sharkey, T. D. (1982) 'Stomatal Conductance and Photosynthesis', *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), pp. 317–345. doi: 10.1146/annurev.pp.33.060182.001533.
- Felix, G., Regenass, M., Boller, T., Miescher-institute, F., Box, P. O. and Basel, C. H. (2000) 'Sensing of osmotic pressure changes in tomato cells.', *Plant physiology*, 124(3), pp. 1169–80.
- Ferrier, J. M. and Dainty, J. (1977) 'Water Flow in *Beta vulgaris* Storage Tissue.', *Plant Physiology*, 60(5), pp. 662–5.
- Finkelstein, A. (1987) *Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes. Theory and Reality*. 1st edn. United States of America
- Finkelstein, R. (2013) 'Absciscic Acid synthesis and response.', *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, 11, p. e0166. doi: 10.1199/tab.0166.
- Fleurat-Lessard, P., Frangne, N., Maeshima, M., Ratajczak, R., Bonnemain, J. L. and Martinoia, E. (1997) 'Increased Expression of Vacuolar Aquaporin and H⁺-ATPase Related to Motor Cell Function in *Mimosa pudica* L.', *Plant physiology*, 114(3), pp. 827–834.
- Flowers, T. J. and Colmer, T. D. (2008) 'Salinity tolerance in halophytes.', *The New phytologist*, 179(4), pp. 945–63. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x.
- Franks, P. J., Buckley, T. N., Shope, J. C. and Mott, K. A. (2001) 'Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe', *Plant Physiology*, 125(4), pp. 1577–1584. doi: 10.1104/pp.125.4.1577.
- Franks, P. J., Drake, P. L. and Froend, R. H. A. Y. H. (2007) 'Anisohydric but isohydrodynamic: Seasonally constant plant water potential gradient explained by a stomatal control

- mechanism incorporating variable plant hydraulic conductance', *Plant, Cell and Environment*, 30(1), pp. 19–30. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01600.x.
- Frensch, J., Hsiao, T. C. and Steudle, E. (1996) 'Water and solute transport along developing maize roots', *Planta*, 198(3), pp. 348–355. doi: 10.1007/BF00620050.
- Frick, A., Järvå, M., Ekvall, M., Uzdaviny, P., Nyblom, M. and Törnroth-Horsefield, S. (2013) 'Mercury increases water permeability of a plant aquaporin through a non-cysteine-related mechanism.', *The Biochemical journal*, 454(3), pp. 491–9. doi: 10.1042/BJ20130377.
- Fricke, W., Bijanzadeh, E., Emam, Y. and Knipfer, T. (2014) 'Root hydraulics in salt-stressed wheat', *Functional Plant Biology*, 41(4), pp. 366–378. doi: 10.1071/FP13219.
- Fritz, M. and Ehwald, R. (2011) 'Mannitol permeation and radial flow of water in maize roots', *New Phytologist*, 189(1), pp. 210–217. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03452.x.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Park, S., Cutler, S. R., Sheen, J. and Rodriguez, P. L. (2010) 'In vitro Reconstitution of an ABA Signaling Pathway', *Nature*, 462(7273), pp. 660–664. doi: 10.1038/nature08599.
- Gajdanowicz, P., Michard, E., Sandmann, M., Rocha, M., Corrêa, L. G. G., Ramírez-Aguilar, S. J., Gomez-Porras, J. L., González, W., Thibaud, J.-B., van Dongen, J. T. and Dreyer, I. (2011) 'Potassium (K⁺) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), pp. 864–869. doi: 10.1073/pnas.1009777108.
- Galvan-Ampudia, C. S. and Testerink, C. (2011) 'Salt stress signals shape the plant root', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 14(3), pp. 296–302. doi: 10.1016/j.pbi.2011.03.019.
- Gambetta, G., Fei, J., Rost, T., Knipfer, T., Matthews, M., Shackel, K., Walker, M. and McElrone, A. (2013) 'Water Uptake along the Length of Grapevine Fine Roots: Developmental Anatomy, Tissue-Specific Aquaporin Expression, and Pathways of Water Transport', *Plant Physiology*, 163(3), pp. 1254–1265. doi: 10.1104/pp.113.221283.
- Gao, Q., Zhao, P., Zeng, X., Cai, X. and Shen, W. (2002) 'A model of stomatal conductance to quantify the relationship between leaf transpiration, microclimate and soil water stress', *Plant, Cell and Environment*. Blackwell Science, Ltd, 25(11), pp. 1373–1381. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00926.x.
- Geng, Y., Wu, R., Wee, C. W., Xie, F., Wei, X., Chan, P. M. Y., Tham, C., Duan, L. and Dinneny, J. R. (2013) 'A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in Arabidopsis.', *The Plant cell*, 25(6), pp. 2132–54. doi: 10.1105/tpc.113.112896.
- Ghoulam, C., Foursy, A. and Fares, K. (2002) 'Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars', *Environmental and Experimental Botany*, 47(1), pp. 39–50. doi: 10.1016/S0098-8472(01)00109-5.
- Giannini, J. L. and Briskin, D. P. (1987) 'Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissues', *Plant Physiology*, 84, pp. 613–618.
- Giaquinta, R. (1977) 'Sucrose Hydrolysis in Relation to Phloem Translocation in *Beta vulgaris*', *Plant Physiology*, 60(3), pp. 339–343.
- Giles, K., Cohen, D. and Beardsell, M. (1976) 'Effects of water Stress on the ultrastructure of leaf cells of sorghum bicolor', *Plant Physiol*, 57, pp. 11–14.

- Hachez, C. and Chaumont, F. (2010) 'Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels.', *Advances in experimental medicine and biology*, 679, pp. 1–17.
- Hachez, C., Zelazny, E. and Chaumont, F. (2006) 'Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions?', *Sciences-New York*, 1758, pp. 1142–1156. doi: 10.1016/j.bbame.2006.02.017.
- Heinen, R. B., Ye, Q. and Chaumont, F. (2009) 'Role of aquaporins in leaf physiology', *Journal of Experimental Botany*, 60(11), pp. 2971–2985. doi: 10.1093/jxb/erp171.
- Henzler, T., Waterhouse, R. N., Smyth, A. J., Carvajal, M., Cooke, D. T., Steudle, E., Clarkson, D. T. and Schäffner, A. R. (1999) 'Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *lotus japonicus*', *Planta*, 210(1), pp. 50–60. doi: 10.1007/s004250050653.
- van den Honert, T. H. (1948) 'Water transport in plants as a catenary process', *Discussions of the Faraday Society*, 3(146), p. 146. doi: 10.1039/df9480300146.
- Horie, T., Costa, A., Houn, T., Han, M. J., Horie, R., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., Schroeder, J. I., Kim, T. H., Han, M. J., Horie, R., Leung, H.-Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G. and Schroeder, J. I. (2007) 'Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth.', *The EMBO journal*, 26(12), pp. 3003–14. doi: 10.1038/sj.emboj.7601732.
- Horie, T., Kaneko, T., Sugimoto, G., Sasano, S., Panda, S. K., Shibasaka, M. and Katsuhara, M. (2011) 'Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots', *Plant and Cell Physiology*, 52(4), pp. 663–675. doi: 10.1093/pcp/pcr027.
- Horie, T., Karahara, I. and Katsuhara, M. (2012) 'Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants', *Rice*, 5(1), p. 11. doi: 10.1186/1939-8433-5-11.
- Huang, C.-W., Domec, J.-C., Ward, E. J., Duman, T., Manoli, G., Parolari, A. J. and Katul, G. G. (2017) 'The effect of plant water storage on water fluxes within the coupled soil-plant system', *New Phytologist*, 213(3), pp. 1093–1106. doi: 10.1111/nph.14273.
- Husken, D., Steudle, E. and Zimmermann, U. (1978) 'Pressure Probe Technique for Measuring Water Relations of Cells in Higher Plants', *Plant Physiology*, 61(2), pp. 158–163. doi: 10.1104/pp.61.2.158.
- Ismail, A., Takeda, S. and Nick, P. (2014) 'Life and death under salt stress: Same players, different timing?', *Journal of Experimental Botany*, 65(12), pp. 2963–2979. doi: 10.1093/jxb/eru159.
- Jang, A. S., Lee, J. U., Choi, I. S., Park, K. O., Lee, J. H., Park, S. W. and Park, C. S. (2004) 'Expression of nitric oxide synthase, aquaporin 1 and aquaporin 5 in rat after bleomycin inhalation', *Intensive Care Medicine*, 30(3), pp. 489–495. doi: 10.1007/s00134-003-2129-9.
- Jarillo, J. A., Capel, J., Tang, R.-H., Yang, H.-Q., Alonso, J. M., Ecker, J. R. and Cashmore, A. R. (2001) 'An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB', *Nature*. Nature Publishing Group, 410(6827), pp. 487–490. doi: 10.1038/35068589.
- Javot, H. (2002) 'The Role of Aquaporins in Root Water Uptake', *Annals of Botany*, 90(3), pp. 301–313. doi: 10.1093/aob/mcf199.
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-laurent, F., Güçlü, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K. I., Schäffner, A. R., Bouchez, D. and Maurel, C. (2003) 'Role of a Single Aquaporin Isoform in Root Water Uptake', 15(2), pp. 509–522. doi: 10.1105/tpc.008888.

- Jozefkowicz, C., Rosi, P., Sigaut, L., Soto, G., Pietrasanta, L. I., Amodeo, G. and Alleva, K. (2013) 'Loop A is critical for the functional interaction of two Beta vulgaris PIP aquaporins.', *PLoS one*, 8(3), p. e57993. doi: 10.1371/journal.pone.0057993.
- Jozefkowicz, C., Sigaut, L., Scochera, F., Soto, G., Ayub, N., Pietrasanta, L. I., Amodeo, G., González Flecha, F. L. and Alleva, K. (2016) 'PIP Water Transport and Its pH Dependence Are Regulated by Tetramer Stoichiometry', *Biophysical Journal*, 110(6), pp. 1312–1321. doi: 10.1016/j.bpj.2016.01.026.
- Karley, A. J. and White, P. J. (2009) 'Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium.', *Current opinion in plant biology*, 12(3), pp. 291–8. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.013.
- Katsuhara, M., Tsuji, N., Shibasaka, M. and Panda, S. K. (2014) 'Osmotic stress decreases PIP aquaporin transcripts in barley roots but H₂O₂ is not involved in this process', *Journal of Plant Research*, 127(6), pp. 787–792. doi: 10.1007/s10265-014-0662-y.
- Kedem, O. and Katchalsky, A. (1958) 'Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes', *Biochimica et Biophysica Acta*, 27, pp. 229–246. doi: 10.1016/0006-3002(58)90330-5.
- Kholodova, V. ., Bolyakina, Y. P., Meshcheryakov, A. B., Ritcher, E., Ehwald, R. and Mashkova, A. K. (1989) 'Transport and distribution of solutes in sugar beet roots', in C., L. B., O., G., and J., K. (eds) *Structural and Functional Aspects of Transport in Roots*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 79–84
- Kirkham, M. B. (2002) 'The Concept of the Soil-Plant-Atmosphere Continuum and Applications', *Environmental Mechanics: Water, Mass and Energy Transfer in the Biosphere*, pp. 327–35. doi: 10.1029/129GM27.
- Knipfer, T. and Fricke, W. (2010) 'Root pressure and a solute reflection coefficient close to unity exclude a purely apoplastic pathway of radial water transport in barley (*Hordeum vulgare*)', *New Phytologist*, 187(1), pp. 159–170. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03240.x.
- Knipfer, T. and Fricke, W. (2011) 'Water uptake by seminal and adventitious roots in relation to whole-plant water flow in barley (*Hordeum vulgare* L.)', *Journal of experimental botany*, 62(2), pp. 717–33. doi: 10.1093/jxb/erq312.
- Kotula, L., Ranathunge, K., Schreiber, L. and Steudle, E. (2009) 'Functional and chemical comparison of apoplastic barriers to radial oxygen loss in roots of rice (*Oryza sativa* L.) grown in aerated or deoxygenated solution', *Journal of Experimental Botany*, 60(7), pp. 2155–2167. doi: 10.1093/jxb/erp089.
- Koyro, H. W., Daoud, S., Harrouni, C. and Huchzermeyer, B. (2006) 'Strategies of a potential cash crop halophyte (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) to avoid salt injury', *Tropical Ecology*, 47(2), pp. 191–200.
- Krieg, J., Hofsteenge, J. and Thomas, G. (1988) 'Identification of the 40 S Ribosomal Protein S6 Phosphorylation Sites Induced by Cycloheximide*', 263(23), pp. 11473–11477.
- Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Franke, R., Prakash, H. S., Schreiber, L. and Mathew, M. K. (2009) 'The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.)', *Planta*, 230(1), pp. 119–34. doi: 10.1007/s00425-009-0930-6.
- Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Nayak, S., Schreiber, L. and Mathew, M. K. (2011) 'Root apoplastic barriers block Na⁺ transport to shoots in rice (*Oryza sativa* L.)', *Journal of experimental botany*, 62(12), pp. 4215–28. doi: 10.1093/jxb/err135.
- Kujala, T., Loponen, J. and Pihlaja, K. (2001) 'Betalains and Phenolics in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Peel Extracts: Extraction and Characterisation', *Zeitschrift für Naturforschung*

- Kulichikhin, K. Y., Greenway, H., Byrne, L. and Colmer, T. D. (2009) 'Regulation of intracellular pH during anoxia in rice coleoptiles in acidic and near neutral conditions', *Journal of Experimental Botany*, 60(7), pp. 2119–2128. doi: 10.1093/jxb/erp090.
- Kuwagata, T. and Murai-Hatano, M. (2007) 'Osmotic water permeability of plasma and vacuolar membranes in protoplasts II. Theoretical basis', *Journal of Plant Research*, 120(2), pp. 193–208. doi: 10.1007/s10265-006-0037-0.
- Kuwahara, M., Gu, Y., Ishibashi, K., Marumo, F. and Sasaki, S. (1997) 'Mercury-sensitive residues and pore site in AQP3 water channel', *Biochemistry*. American Chemical Society, 36(46), pp. 13973–13978. doi: 10.1021/bi9711442.
- Latorre, M. E., Narvaiz, P., Rojas, A. M., Gerschenson, L. N., Ecology, P., Source, O. P., Press, C., Url, S., Latorre, M. E., Narvaiz, P., Rojas, A. M. and Gerschenson, L. N. (2010) 'Effects of gamma irradiation on bio-chemical and physico-chemical parameters of fresh-cut red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) root', *Journal of Food Engineering*, 98(2), pp. 178–191. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2009.12.024.
- Laur, J. and Hacke, U. G. (2014) 'Exploring Picea glauca aquaporins in the context of needle water uptake and xylem refilling', *New Phytologist*, 203(2), pp. 388–400. doi: 10.1111/nph.12806.
- Lawson, T. and Blatt, M. R. (2014) 'Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency', *Plant Physiology*, 164(4), pp. 1556–1570. doi: 10.1104/pp.114.237107.
- Leigh, R. A. and Branton, D. (1976) 'Isolation of Vacuoles from Root Storage Tissue of', *Plant Physiology*, (58), pp. 656–662.
- Leitão, L., Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., Moura, T. F. and Soveral, G. (2014) 'The grapevine tonoplast aquaporin TIP2;1 is a pressure gated water channel', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), pp. 289–294. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.121.
- Li, X., Wang, X., Yang, Y., Li, R., He, Q., Fang, X., Luu, D.-T., Maurel, C. and Lin, J. (2011) 'Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation.', *The Plant cell*, 23(10), pp. 3780–97. doi: 10.1105/tpc.111.091454.
- Lian, H. L., Yu, X., Ye, Q., Ding, X. S., Kitagawa, Y., Kwak, S. S., Su, W. A. and Tang, Z. C. (2004) 'The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice', *Plant and Cell Physiology*, 45(4), pp. 481–489. doi: 10.1093/pcp/pch058.
- Lindhauer, M. G., Haeder, H. E. and Beringer, H. (1990) 'Osmotic potentials and solute concentrations in sugar beet plants cultivated with varying potassium/sodium ratios', *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. Wiley-VCH Verlag, 153(1), pp. 25–32. doi: 10.1002/jpln.19901530107.
- Liu, C., Fukumoto, T., Matsumoto, T., Gena, P., Frascaria, D., Kaneko, T., Katsuhara, M., Zhong, S., Sun, X., Zhu, Y., Iwasaki, I., Ding, X., Calamita, G. and Kitagawa, Y. (2013) 'Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 63, pp. 151–158. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.11.018.
- Liu, P., Yin, L., Deng, X., Wang, S., Tanaka, K. and Zhang, S. (2014) 'Aquaporin-mediated increase in root hydraulic conductance is involved in silicon-induced improved root water uptake under osmotic stress in *Sorghum bicolor* L.', *Journal of Experimental Botany*, 65(17), pp. 4747–4756. doi: 10.1093/jxb/eru220.
- Lopez-Perez, L., Fernandez-Garcia, N., Olmos, E. and Carvajal, M. (2007) 'The Phi

- Thickening in Roots of Broccoli Plants: An Acclimation Mechanism to Salinity?', *International Journal of Plant Sciences*, 168(8), pp. 1141–1149. doi: 10.1086/520722.
- Luu, D.-T., Martinière, A., Sorieul, M., Runions, J. and Maurel, C. (2011) 'Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress.', *The Plant journal: for cell and molecular biology*, pp. 1–12. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04841.x.
- Maathuis, F. J. M. (2006) 'The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity', *Journal of Experimental Botany*, 57(5), pp. 1137–1147. doi: 10.1093/jxb/erj001.
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Horie, T. and Katsuhara, M. (2008) 'Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in Nicotiana tabacum plants.', *Plant & cell physiology*, 49(5), pp. 801–13. doi: 10.1093/pcp/pcn054.
- Martínez-Ballesta, M. C., Aparicio, F., Pallás, V., Martínez, V. and Carvajal, M. (2003) 'Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in Arabidopsis.', *Journal of Plant Physiology*, 160(6), pp. 689–697.
- Martínez-Ballesta, M. C., Diaz, R., Martínez, V. and Carvajal, M. (2003) 'Different blocking effects of HgCl₂ and NaCl on aquaporins of pepper plants.', *Journal of Plant Physiology*, 160(12), pp. 1487–1492.
- Martínez-Ballesta, M. C., Martínez, V. and Carvajal, M. (2003) 'Aquaporin functionality in relation to H⁺-ATPase activity in root cells of Capsicum annuum grown under salinity.', *Physiologia Plantarum*, 117(3), pp. 413–420.
- Martínez-ballesta, M. C., Rodríguez-, M. C., Alcaraz-lópez, C., Mota-cadenas, C., Muries, B. and Carvajal, M. (2011) 'Plant Hydraulic Conductivity: The Aquaporins Contribution', *Hydraulic Conductivity - Issues, Determination and Applications*.
- Martinoia, E., Maeshima, M. and Neuhaus, H. E. (2007) 'Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism.', *Journal of experimental botany*, 58(1), pp. 83–102. doi: 10.1093/jxb/erl183.
- Martinoia, E., Meyer, S., De Angeli, A., Nagy, R., Angeli, A. De, De Angeli, A. and Nagy, R. (2012) 'Vacuolar Transporters in Their Physiological Context', *Annu. Rev. Plant Biol*, 63(1), pp. 183–213. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105608.
- Matsuo, N., Ozawa, K. and Mochizuki, T. (2009) 'Genotypic differences in root hydraulic conductance of rice (Oryza sativa L.) in response to water regimes', *Plant and Soil*, 316(1–2), pp. 25–34. doi: 10.1007/s11104-008-9755-5.
- Maurel, C., Simonneau, T. and Sutka, M. (2010) 'The significance of roots as hydraulic rheostats.', *Journal of experimental botany*, 61(12), pp. 3191–8. doi: 10.1093/jxb/erq150.
- Maurel, C., Tacnet, F., Gcl, J., Guern, J. and Ripoche, P. (1997) 'Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity', *Plant Biology*, 94, pp. 7103–7108.
- Meinild, A., Klaerke, D. and Zeuthen, T. (1998) 'Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5', *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), pp. 32446–32451. doi: 10.1074/jbc.273.49.32446.
- Meng, D., Walsh, M., Fricke, W. (2016) 'Rapid changes in root hydraulic conductivity and aquaporin expression in rice (Oryza sativa L.) in response to shoot removal – xylem tension as a possible signal', *Annals of Botany*. Oxford University Press, 118(4), pp. 809–819. doi: 10.1093/aob/mcw150.

- Mittler, R. and Blumwald, E. (2015) 'The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation.', *The Plant cell*, 27(1), pp. 64–70. doi: 10.1105/tpc.114.133090.
- Miyamoto, N., Steudle, E., Hirasawa, T. and Lafitte, R. (2001) 'Hydraulic conductivity of rice roots.', *Journal of experimental botany*, 52(362), pp. 1835–1846. doi: 10.1093/jexbot/52.362.1835.
- Møller, I. S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G. M., Roy, S. J., Coates, J. C., Haseloff, J. and Tester, M. (2009) 'Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in Arabidopsis.', *The Plant cell*, 21(July), pp. 2163–2178. doi: 10.1105/tpc.108.064568.
- Morgan, J. M. (1984) 'Osmoregulation and water stress in higher plants', *Ann. Rev. Plant. Physiol.* (35), pp. 299–319.
- Morillon, R. and Lassalles, J. P. (1999) 'Osmotic water permeability of isolated vacuoles', *Planta*, 210(1), pp. 80–84. doi: 10.1007/s004250050656.
- Moshelion, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N. and Kaldenhoff, R. (2002) 'Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation.', *The Plant cell*, 14(3), pp. 727–39. doi: 10.1105/tpc.010351.
- Moshelion, M., Moran, N. and Chaumont, F. (2004) 'Dynamic changes in the osmotic water permeability of protoplast plasma membrane', *Plant Physiology*, 135(8), pp. 2301–2317. doi: 10.1104/pp.104.043000.1.
- Mu, Z., Zhang, S., Zhang, L., Liang, A. and Liang, Z. (2006) 'Hydraulic conductivity of whole root system is better than hydraulic conductivity of single root in correlation with the leaf water status of maize', *Botanical Studies*, 47(2), pp. 145–151.
- Mulders, S. M., Rijss, J. P. L., Hartog, A., Bindels, R. J., van Os, C. H. and Deen, P. M. T. (1997) 'Importance of the mercury-sensitive cysteine on function and routing of AQP1 and AQP2 in oocytes.', *The American journal of physiology*, 273(3 Pt 2), pp. F451-6.
- Munns, R. (2002) 'Comparative physiology of salt and water stress.', *Plant, cell & environment*, 25(2), pp. 239–250. doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x.
- Munns, R., Passioura, J. B., Guo, J., Chazen, O. and Cramer, G. R. (2000) 'Water relations and leaf expansion: importance of time scale.', *Journal of experimental botany*, 51(350), pp. 1495–504.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) 'Mechanisms of salinity tolerance.', *Annual review of plant biology*, 59, pp. 651–81. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- Muries, B., Carvajal, M. and Martínez-Ballesta, M. del C. (2013) 'Response of three broccoli cultivars to salt stress, in relation to water status and expression of two leaf aquaporins', *Planta*, 237(5), pp. 1297–1310. doi: 10.1007/s00425-013-1849-5.
- Mutasa-Gottgens, E. S., Joshi, A., Holmes, H. F., Hedden, P. and Gottgens, B. (2012) 'A new RNASeq-based reference transcriptome for sugar beet and its application in transcriptome-scale analysis of vernalization and gibberellin responses', *BMC Genomics*, 13(1), p. 99. doi: 10.1186/1471-2164-13-99.
- Nandini, P., Jorgensen, K. and Jorgense, H. (2013) 'Red beet as a model System for studying vacuola transport fo primary and secondary metabolites', in Neelwarne, B. (ed.) *Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications*. Springer, pp. 75–90. doi: 10.1007/978-1-4614-3458-0.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C., Franke, R., Nawrath, C. and Geldner, N. (2012) 'Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin.',

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(25), pp. 10101–6. doi: 10.1073/pnas.1205726109.

- Negrão, S., Schmöckel, S. M. and Tester, M. (2016) 'Evaluating physiological responses of plants to salinity stress', *Annals of Botany*. doi: 10.1093/aob/mcw191.
- Neuhaus, H. E. and Trentmann, O. (2014) 'Regulation of transport processes across the tonoplast.', *Frontiers in plant science*, 5(9), p. 460. doi: 10.3389/fpls.2014.00460.
- Neumann, R. B., Cardon, Z. G., Teshera-Levy, J., Rockwell, F. E., Zwieniecki, M. A. and Holbrook, N. M. (2014) 'Modelled hydraulic redistribution by sunflower (*Helianthus annuus* L.) matches observed data only after including night-time transpiration', *Plant, Cell & Environment*, 37(4), pp. 899–910. doi: 10.1111/pce.12206.
- Niemietz, C. M. and Tyerman, S. D. (1997) 'Characterization of Water Channels in Wheat Root Membrane Vesicles.', *Plant physiology*, 115(2), pp. 561–567. doi: 10.1104/pp.115.2.561.
- Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M. (1995) 'Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments', *Plant Physiol*, 109, pp. 735–742
- Nobel, P. S. (2009) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 4th edition. By Park S. Nobel. Amsterdam, Academic Press, pp. 582, ISBN 978-0-12-374143-1.
- North, G. B., Lynch, F. H., Maharaj, F. D. R., Phillips, C. A. and Woodside, W. T. (2013) 'Leaf hydraulic conductance for a tank bromeliad: axial and radial pathways for moving and conserving water.', *Frontiers in plant science*, 4(April), p. 78. doi: 10.3389/fpls.2013.00078.
- Ozu, M., Dorr, R. A., Gutiérrez, F., Teresa Politi, M. and Toriano, R. (2013) 'Human AQP1 is a constitutively open channel that closes by a membrane-tension-mediated mechanism', *Biophysical Journal*, 104(1), pp. 85–95. doi: 10.1016/j.bpj.2012.11.3818.
- Pakniyat, H. and Armion, M. (2007) 'Sodium and proline accumulation as osmoregulators in tolerance of sugar beet genotypes to salinity.', *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(22), pp. 4081–6.
- Pantin, F., Monnet, F., Jannaud, D., Costa, J. M., Renaud, J., Muller, B., Simonneau, T. and Genty, B. (2013) 'The dual effect of abscisic acid on stomata', *New Phytologist*, 197(1), pp. 65–72. doi: 10.1111/nph.12013.
- Peng, Y.-H., Zhu, Y.-F., Mao, Y.-Q., Wang, S.-M., Su, W.-A. and Tang, Z.-C. (2004) 'Alkali grass resists salt stress through high [K⁺] and an endodermis barrier to Na⁺.', *Journal of experimental botany*, 55(398), pp. 939–49. doi: 10.1093/jxb/erh071.
- Peñuelas, J., Filella, I., Serrano, L. and Savé, R. (1996) 'Cell wall elasticity and Water Index (R970 nm/R900 nm) in wheat under different nitrogen availabilities', (2), pp. 373–382.
- Perry, C. A., Leigh, R. A., Tomos, A. D., Wyse, R. E. and Hall, J. L. (1987) 'The regulation of turgor pressure during sucrose mobilisation and salt accumulation by excised storage-root tissue of red beet', *Planta*, 170(3), pp. 353–361. doi: 10.1007/BF00395027.
- Peyronnet, R., Tran, D., Girault, T., Frachisse, J.-M., Centre, V., De, N., Scientifique, R. and Sciences, S. P. (2014) 'Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure.', *Frontiers in plant science*, 5(10), p. 558. doi: 10.3389/fpls.2014.00558.
- Philip, J. R. (1966) 'Plant Water Relations: Some Physical Aspects', *Annual Review of Plant Physiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , 17(1), pp. 245–268. doi: 10.1146/annurev.pp.17.060166.001333.

- Pi, Z., Stevanato, P., Yv, L. H., Geng, G., Guo, X. L., Yang, Y., Peng, C. X. and Kong, X. S. (2014) 'Effects of potassium deficiency and replacement of potassium by sodium on sugar beet plants', *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(2), pp. 224–230. doi: 10.1134/S1021443714020101.
- Poole, R. J. (1971) 'Effect of Sodium on Potassium Fluxes and Vacuole Membrane of Red Beet1 at the Cell Membrane', *Plant Physiology*, pp. 731–734.
- Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Grondin, A., Boursiac, Y., Morillon, R., Schäffner, A. R. and Maurel, C. (2010) 'A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis.', *Plant physiology*, 152(3), pp. 1418–30. doi: 10.1104/pp.109.145326.
- Postaire, O., Verdoucq, L. and Maurel, C. (2008) 'Aquaporins in Plants- From Molecular Structure to Integrated Functions', *Advances in Botanical Research*. Academic Press (Advances in Botanical Research), 46(7), pp. 75–136. doi: 10.1016/S0065-2296(07)46003-7.
- Pottosin, I. and Shabala, S. (2014) 'REVIEW: Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling.', *Frontiers in plant science*, 5(4), p. 154. doi: 10.3389/fpls.2014.00154.
- Qi, X., Tai, C. Y. and Wasserman, B. P. (1995) 'Plasma membrane intrinsic proteins of Beta vulgaris L.', *Plant physiology*, 108(1), pp. 387–92.
- Qian, Z. J., Song, J. J., Chaumont, F. and Ye, Q. (2014) 'Differential responses of plasma membrane aquaporins in mediating water transport of cucumber seedlings under osmotic and salt stresses', *Plant, Cell and Environment*, pp. 461–473. doi: 10.1111/pce.12319.
- Rabinowitch, S., Grover, N. B. and Ginzburg, B. Z. (1975) 'Cation effects on volume and water permeability in the halophilic algae Dunaliella parva', *The Journal of Membrane Biology*. Springer-Verlag, 22(1), pp. 211–230. doi: 10.1007/BF01868172.
- Rahnama, A., James, R. A., Poustini, K. and Munns, R. (2010) 'Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil', *Functional Plant Biology*, 37(3), pp. 255–263. doi: 10.1071/FP09148.
- Rahnama, A., Munns, R., Poustini, K. and Watt, M. (2011) 'A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient', *Journal of Experimental Botany*, 62(1), pp. 69–77. doi: 10.1093/jxb/erq359.
- Ramahaleo, T., Morillon, R., Alexandre, J. and Lassalles, J.-P. (1999) 'Osmotic water permeability of isolated protoplasts. Modifications during development', *Plant physiology*. American Society of Plant Biologists, 119(3), pp. 885–96. doi: 10.1104/PP.119.3.885.
- Raschke, K. and Dickerson, M. (1973) 'Changes in shape and volume of guard cells during stomatal movement', *Plant Res.* 1973;1972:149–153.
- Reef, R. and Lovelock, C. E. (2015) 'Regulation of water balance in Mangroves', *Annals of Botany*, 115(3), pp. 385–395. doi: 10.1093/aob/mcu174.
- Reguera, M., Peleg, Z. and Blumwald, E. (2012) 'Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), pp. 186–194. doi: 10.1016/j.bbagrm.2011.08.005.
- Reisen, D., Marty, F., Leborgne-Castel, N. (2005) 'New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress.', *BMC plant biology*. BioMed Central, 5(1), p. 13. doi: 10.1186/1471-2229-5-13.

- Rutschow, H. L., Baskin, T. I. and Kramer, E. M. (2011) 'Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem.', *Plant physiology*, 155(4), pp. 1817–1826. doi: 10.1104/pp.110.168187.
- Sack, L. and Holbrook, N. M. (2006) 'Leaf Hydraulics', *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), pp. 361–381. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144141.
- Sack, L. and Scoffoni, C. (2012) 'Measurement of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance and their responses to irradiance and dehydration using the Evaporative Flux Method (EFM).', *Journal of visualized experiments: JoVE*, (70), p. e4179. doi: 10.3791/4179.
- Sadok, W. and Sinclair, T. R. (2010) 'Transpiration response of "slow-wilting" and commercial soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes to three aquaporin inhibitors', *Journal of experimental botany*, 61(3), pp. 821–829. doi: 10.1093/jxb/erp350.
- Sadzawka, A., Carrasco, M., Demanet, R., H., F., Grez, R., Mora, M. and Neaman, A. (2007) *Metodos de análisis en tejidos vegetales*. 2nd edn. Edited by I. de I. Agropecuarias. Santiago de Chile, Chile: Series Actas INIA N° 40.
- Savage, D. F. and Stroud, R. M. (2007) 'Structural Basis of Aquaporin Inhibition by Mercury', *Journal of Molecular Biology*, 368(3), pp. 607–617. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.070.
- Schreiber, L., Franke, R., Hartmann, K.-D., Ranathunge, K. and Steudle, E. (2005) 'The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix).', *Journal of Experimental Botany*, 56(415), pp. 1427–1436. doi: 10.1093/jxb/eri144.
- Secchi, F., Lovisolo, C., Uehlein, N., Kaldenhoff, R. and Schubert, A. (2007) 'Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.).', *Planta*, 225(2), pp. 381–92. doi: 10.1007/s00425-006-0365-2.
- Shabala, S. (2013) 'Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops.', *Annals of botany*, 112(7), pp. 1209–21. doi: 10.1093/aob/mct205.
- Shabala, S. and Cuin, T. A. (2008) 'Potassium transport and plant salt tolerance.', *Physiologia Plantarum*, 133(4), pp. 651–669.
- Shabala, S., Shabala, S., Cuin, T. A., Pang, J., Percey, W., Chen, Z., Conn, S., Eing, C. and Wegner, L. H. (2010) 'Xylem ionic relations and salinity tolerance in barley.', *The Plant Journal*, 61(5), pp. 839–853.
- Shabala, S., Wu, H. and Bose, J. (2015) 'Salt stress sensing and early signalling events in plant roots: Current knowledge and hypothesis', *Plant Science*, 241, pp. 109–119. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.10.003.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J. and Nguyen, H. T. (2004) 'Root growth maintenance during water deficits: Physiology to functional genomics', *Journal of Experimental Botany*, 55(407), pp. 2343–2351. doi: 10.1093/jxb/erh276.
- Shetty, N. P., Jørgensen, K. and Jørgensen, H. J. L. (2013) 'Red Beet as a Model System for Studying Vacuolar Transport of Primary and Secondary Metabolites', in *Red Beet Biotechnology*. Boston, MA: Springer US, pp. 75–90. doi: 10.1007/978-1-4614-3458-0_4.
- Siefritz, F., Otto, B., Bienert, G. P., Van Der Krol, A. and Kaldenhoff, R. (2004) 'The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco', *The Plant Journal*. Blackwell Science Ltd, 37(2), pp. 147–155. doi:

- Skorupa-Klaput, M., Szczepanek, J., Kurnik, K., Tretyn, A. and Tyburski, J. (2015) 'The expression patterns of plasma membrane aquaporins in leaves of sugar beet and its halophyte relative, *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, in response to salt stress', *Biologia (Poland)*, 70(4), pp. 467–477. doi: 10.1515/biolog-2015-0056.
- Somma, F., Hopmans, J. W. and Clausnitzer, V. (1998) 'Transient three-dimensional modeling of soil water and solute transport with simultaneous root growth, root water and nutrient uptake', *Plant and Soil*, 202(2), pp. 281–293. doi: 10.1023/A:1004378602378.
- Sommer, A., Mähknecht, A. G., Mähknecht, G. and Obermeyer, G. (2007) 'Measuring the osmotic water permeability of the plant protoplast plasma membrane: implication of the nonosmotic volume.', *The Journal of membrane biology*, 215(2–3), pp. 111–23. doi: 10.1007/s00232-007-9011-6.
- Soto, G., Fox, R., Ayub, N., Alleva, K., Guaimas, F., Erijman, E. J., Mazzella, A., Amodeo, G. and Muschietti, J. (2010) 'TIP5;1 is an aquaporin specifically targeted to pollen mitochondria and is probably involved in nitrogen remobilization in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Journal*, 64(6), pp. 1038–1047. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04395.x.
- Steppe, K., Cochard, H., Lacomte, A. and Améglio, T. (2012) 'Could rapid diameter changes be facilitated by a variable hydraulic conductance?', *Plant, cell & environment*, 35(1), pp. 150–7. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02424.x.
- Steudle, E. (2000) 'Water uptake by roots: effects of water deficit.', *Journal of experimental botany*, 51(350), pp. 1531–42.
- Steudle, E. and Boyer, J. S. (1985) 'Hydraulic resistance to radial water flow in growing hypocotyl of soybean measured by a new pressure-perfusion technique', *Planta*, 164(2), pp. 189–200. doi: 10.1007/BF00396081.
- Steudle, E., Murrmann, M. and Peterson, C. a. (1993) 'Transport of Water and Solutes across Maize Roots Modified by Puncturing the Endodermis (Further Evidence for the Composite Transport Model of the Root).', *Plant physiology*, 103(2), pp. 335–349.
- Steudle, E. and Peterson, C. a (1998) 'How does water get through roots?', *Journal of Experimental Botany*, 49(322), pp. 775–788. doi: 10.1093/jxb/49.322.775.
- Steudle, E. and Ranathunge, K. (2007) 'Apoplastic water transport in roots', in *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions: The Significance of the Apoplast for the Mineral Nutrition of Higher Plants*, pp. 119–130. doi: 10.1007/978-1-4020-5843-1_9.
- Steudle, E., Zimmermann, U., Cells, P. and Lutge, U. (1977) 'Effect of turgor pressure and cell size on the wall elasticity of plant cells.', *Plant physiology*, 59(2), pp. 285–289. doi: 10.1104/pp.59.2.285.
- Subbarao, G. V., Wheeler, R. M., Stutte, G. W. and Levine, L. H. (1999) 'How far can sodium substitute for potassium in red beet?', *Journal of Plant Nutrition*, 22(11), pp. 1745–1761.
- Suku, S., Knipfer, T. and Fricke, W. (2014) 'Do root hydraulic properties change during the early vegetative stage of plant development in barley (*Hordeum vulgare*)?', *Annals of Botany*, 113(3), pp. 385–402. doi: 10.1093/aob/mct270.
- Sutka, M. (2005) Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Sutka, M., Alleva, K., Parisi, M. and Amodeo, G. (2005) 'Tonoplast vesicles of *Beta vulgaris* storage root show functional aquaporins regulated by protons.', *Biology of the cell* /

- under the auspices of the European Cell Biology Organization, 97(11), pp. 837–46. doi: 10.1042/BC20040121.
- Sutka, M., Li, G., Boudet, J., Boursiac, Y., Doumas, P. and Maurel, C. (2011) 'Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* grown in normal and salt-stressed conditions.', *Plant physiology*, 155(3), pp. 1264–1276. doi: 10.1104/pp.110.163113.
- Sutka, M. R., Manzur, M. E., Vitali, V. A., Micheletto, S. and Amodeo, G. (2016) 'Evidence for the involvement of hydraulic root or shoot adjustments as mechanisms underlying water deficit tolerance in two *Sorghum bicolor* genotypes', *Journal of Plant Physiology*. Elsevier GmbH., 192, pp. 13–20. doi: 10.1016/j.jplph.2016.01.002.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M. (Ian M. and Murphy, A. S. (2015) *Plant physiology and development*. 6th edn. published by Sinauer Associates, ISBN: 9781605353531.
- Taleisnik, E., Peyrano, G., Cordoba, a. and Arias, C. (1999) 'Water Retention Capacity in Root Segments Differing in the Degree of Exodermis Development', *Annals of Botany*, 83, pp. 19–27. doi: 10.1006/anbo.1998.0781.
- Tardieu, F. and Davies, W. J. (1993) 'Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants', *Plant, Cell & Environment*, 16(4), pp. 341–349. doi: 10.1111/j.1365-3040.1993.tb00880.x.
- Tardieu, F., Simonneau, T. and Parent, B. (2015) 'Modelling the coordination of the controls of stomatal aperture, transpiration, leaf growth, and abscisic acid: Update and extension of the Tardieu-Davies model', *Journal of Experimental Botany*, 66(8), pp. 2227–2237. doi: 10.1093/jxb/erv039.
- Tester, M. and Davenport, R. (2003) 'Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants', *Annals of Botany*, 91(5), pp. 503–527. doi: 10.1093/aob/mcg058.
- To, J. and Torres, J. (2015) 'Can stabilization and inhibition of aquaporins contribute to future development of biomimetic membranes?', *Membranes*, 5(3), pp. 352–368. doi: 10.3390/membranes5030352.
- Tomos, A. D., Leigh, R. A., Palta, J. A. and Williams, J. H. H. (1992) 'Sucrose and cell water relations', in Pollock, C. J. and Farrar, J. F. (eds) *Carbon partitioning within and between organisms*. Oxford. Biosis Scientific Publishers, pp. 71–89
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.-T., Bligny, R. and Maurel, C. (2003) 'Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins.', *Nature*, 425(6956), pp. 393–7. doi: 10.1038/nature01853.
- Turner, N. C. (1981) 'Chapter 3, Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status', *Plant and Soil*, 366, pp. 339–366.
- Tyerman, S. D., Niemietz, C. M. and Bramley, H. (2002) 'Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles', *Plant, Cell and Environment*, 25(2), pp. 173–194. doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00791.x.
- Tyerman, S. D. and Steudle, E. (1984) 'Determination of Solute Permeability in Chara Internodes by a Turgor Minimum Method ", 12, pp. 464–468.
- Tyree, M. (2003) 'Hydraulic Properties of Roots', in Kroon, H. de and Visser, E. J. W. (eds) *Root Ecology*. 1st edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 125–150. doi: 10.1007/978-3-662-09784-7_5.
- Tyree, M. T. and Zimmermann, M. H. (2002) 'The Cohesion-Tension Theory of Sap Ascent', in Chapter 3, *Xylem Structure and the Ascent of Sap*, published by Springer Berlin Heidelberg, pp. 49–88. ISBN 978-3-642-07768-5. doi: 10.1007/978-3-662-04931-0_3.

- Vandeleur, R. K., Mayo, G., Shelden, M. C., Gilliam, M., Kaiser, B. N. and Tyerman, S. D. (2009) 'The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine.', *Plant physiology*, 149(1), pp. 445–60. doi: 10.1104/pp.108.128645.
- Vandeleur, R. K., Sullivan, W., Athman, A., Jordans, C., Gilliam, M., Kaiser, B. N. and Tyerman, S. D. (2014) 'Rapid shoot-to-root signalling regulates root hydraulic conductance via aquaporins', *Plant, Cell and Environment*, 37(2), pp. 520–538. doi: 10.1111/pce.12175.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. J. K. and Zhu, J. J. K. (2006) 'Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status', *Plant Journal*, 45(4), pp. 523–539. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x.
- Vitali, V., Bellati, J., Soto, G., Ayub, N. D. and Amodeo, G. (2015) 'Root hydraulic conductivity and adjustments in stomatal conductance: hydraulic strategy in response to salt stress in a halotolerant species', *AoB Plants*, 7, p. plv136. doi: 10.1093/aobpla/plv136.
- Voicu, M. C. and Zwiazek, J. J. (2004) 'Cycloheximide inhibits root water flow and stomatal conductance in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings', *Plant, Cell and Environment*, 27(2), pp. 199–208. doi: 10.1111/j.1365-3040.2003.01135.x.
- Wakeel, A., Steffens, D. and Schubert, S. (2010) 'Potassium substitution by sodium in sugar beet (*Beta vulgaris*) nutrition on K-fixing soils', *Journal Of Plant Nutrition And Soil Science*, 173(1), pp. 127–134. doi: 10.1002/jpln.200900270.
- Wang, W., Yang, X., Zhang, S. and Sun, Y. (2013) 'The root cortex cell hydraulic conductivity is enhanced with increasing chromosome ploidy in wheat', *Plant Physiology and Biochemistry*, 68, pp. 37–43. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.03.021.
- Wang, X., Li, Y., Ji, W., Bai, X., Cai, H., Zhu, D., Sun, X.-L., Chen, L.-J. and Zhu, Y.-M. (2011) 'A novel Glycine soja tonoplast intrinsic protein gene responds to abiotic stress and depresses salt and dehydration tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*.' , *Journal of plant physiology*. Elsevier GmbH., pp. 1–8. doi: 10.1016/j.jplph.2011.01.016.
- Weatherley, P. (1950) 'Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves.', *New Phytologist*, 49(1), pp. 81–97.
- Wegner, L. H. (2014) 'Root pressure and beyond: energetically uphill water transport into xylem vessels?', *Journal of experimental botany*, 65(2), pp. 381–93. doi: 10.1093/jxb/ert391.
- Wendler, S., Zimmermann, U. (1985) 'Compartment Analysis of Plant Cells by Means of Turgor Pressure Relaxation': *Journal of membrane Biology*, 142 (85), pp. 133–142.
- Wolfe, J., Dowgert, M. and Steponkus, P. (1986) 'Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansions', *The Journal of Membrane Biology*, 93, pp. 63–74. doi: 10.1007/BF01871019.
- Wolfe, J. and Steponkus, P. L. (1981) 'The stress-strain relation of the plasma membrane of isolated plant protoplasts.', *Biochimica et biophysica acta*, 643(3), pp. 663–8.
- Wu, Y., Liu, X., Wang, W., Zhang, S. and Xu, B. (2012) 'Calcium regulates the cell-to-cell water flow pathway in maize roots during variable water conditions', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 58, pp. 212–219. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.07.005.
- Wyse, R. (1979) 'Sucrose uptake by sugar beet tap root tissue.', *Plant physiology*, 64(5), pp. 837–41. doi: 10.1104/pp.64.5.837.

- Yaaran, A. and Moshelion, M. (2016) 'Role of aquaporins in a composite model of water transport in the leaf', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), pp. 19–23. doi: 10.3390/ijms17071045.
- Yanef, A., Sigaut, L., Marquez, M., Alleva, K., Pietrasanta, L. I. and Amodeo, G. (2014) 'Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), pp. 231–236. doi: 10.1073/pnas.1316537111.
- Yanef, A., Vitali, V. and Amodeo, G. (2015) 'PIP1 aquaporins: Intrinsic water channels or PIP2 aquaporin modulators?', *FEBS Letters*, 589(23), pp. 3508–3515. doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.018.
- Zamski, E. (1986) 'Structure and Function of Beta vulgaris Parenchyma Cells: Ultrastructure and Sugar Uptake Characteristics of Tissue and Cell in Suspension', *Botanical Gazette*, 147(1), pp. 20–27.
- Zeppel, M. J. B., Lewis, J. D., Phillips, N. G. and Tissue, D. T. (2014) 'Consequences of nocturnal water loss: A synthesis of regulating factors and implications for capacitance, embolism and use in models', *Tree Physiology*, 34(10), pp. 1047–1055. doi: 10.1093/treephys/tpu089.
- Zhang, C., Hicks, G. R., Raikhel, N. V and Jiang, L. (2014) 'Plant vacuole morphology and vacuolar trafficking'. doi: 10.3389/fpls.2014.00476.
- Zhang, W.-H. and Tyerman, S. D. (1999) 'Inhibition of Water Channels by HgCl₂ in Intact Wheat Root Cells', *Plant physiology*, 120(3), pp. 849–858. doi: 10.1104/pp.120.3.849.
- Zhu, J. (2001) 'Plant salt tolerance', *Trends in Plant Science*, 6(2), pp. 66–71. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01838-0.
- Zhuang, J., Yu, G.-R. and Nakayama, K. (2014) 'A Series RCL Circuit Theory for Analyzing Non-Steady-State Water Uptake of Maize Plants.', *Scientific reports*, 4, p. 6720. doi: 10.1038/srep06720.
- Zimmermann, H. M., Hartmann, K., Schreiber, L. and Steudle, E. (2000) 'Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.).', *Planta*, 210(2), pp. 302–311. doi: 10.1007/PL00008138.
- Zimmermann, H. M. and Steudle, E. (1998) 'Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis on JSTOR', *Planta*, 206(1), pp. 7–19.

Publicaciones

Parte de los resultados presentados en esta Tesis se encuentran publicados.